DIE BEDEUTUNG EINES 83 KD GLYKOPROTEINS BEI DER WACHSTUMSKONTROLLE VON MELANOMZELLEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

ILSE WIELAND
aus Schwäbisch Hall

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0066

DIE BEDEUTUNG EINES 83 KD GLYKOPROTEINS BEI DER WACHSTUMSKONTROLLE VON MELANOMZELLEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

ILSE WIELAND
aus Schwäbisch Hall

1986

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 12. 1986
Dekan: Prof. Dr. W. Engels
1. Berichterstatter: Dr. habil. R. Kemler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Ammermann

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Dr. Walter Birchmeier am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft durchgeführt.

Herrn Dr. Walter Birchmeier danke ich für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für viele hilfreiche Diskussionen und Ratschläge. Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für ihre kollegiale Zusammenarbeit und für ihre Bereitschaft zur Diskussion. Insbesondere danke ich Frau Dr. Gertraud Müller für hochreinen TGF-ß und Susanne Braun für ihre Hilfe bei verschiedenen Experimenten.

Herrn Dr. R. Grosse (Berlin), Herrn Dr. M. Hosang (Basel), Herrn Dr. H. Rohrer und Herrn Dr. H. Thoenen (München) danke ich für die Wachtumsfaktoren EGF, PDGF und NGF.

Bei Herrn Dr. Karl-Heinz Westphal (München) bedanke ich mich recht herzlich für seine freundschaftlichen Unterstützungen.

Frau Roswitha Grömke-Lutz und Frau Gunilla Weinraub danke ich für ihre Hilfe bei den Abbildungen. Bei Frau Carla Fickenscher und Frau Renate Brodbeck bedanke ich mich für ihre Hilfe bei der Anfertigung des Manuskriptes.

Teile dieser Arbeit sind in folgende Puplikationen eingegangen

Vollmers, H.P., Imhof, B.A., Wieland, I., Hiesel, A., and Birchmeier, W. (1985). Monoclonal antibodies NORM-1 and NORM-2 induce more normal behavior of tumor cells in_vitro and reduce tumor growth in_vivo. Cell 40, 547-557.

Wieland, I., Vollmers, H.P., and Birchmeier, W. (1985). The antibody NORM-2 induces a less transformed phenotype in tumour cells: Characterisation of the NORM-2 Antigen. Europ. J. Cell Biol., Supplement 8, 36, 24, Abstract

Wieland, I. and Birchmeier, W. (1986). An 83kd surface protein is involved in growth inhibition of B16 melanoma cells. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367 Supplement, 311, Abstract

Wieland, I., Müller, G., Braun, S., and Birchmeier, W. (1986). Reversion of the transformed phenotype of B16 mouse melanoma: Involvement of an 83kd cell surface glycoprotein in specific growth inhibition. Cell in press.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

Seite

ZUSAMMENFASSUNG 1- 2

EINLEITUNG 3-19

Wie entstehen Tumorzellen? 3

Wie können Tumorzellen gehemmt werden? 11

Problematik und Ziel dieser Arbeit 18

MATERIAL-UND-METHODEN 20-42

Zellen und Zellkultur 20

Induktion von "capping" und Immunfluoreszenz von Zelloberflächen-Antigen 21

Indirekter Radioimmunassay an lebenden Zellen 23

Bindungstest mit jodiertem "nerve growth factor" (NGF) 24

ELISA 24

Radioaktive Markierungen 26

Zell-Lysis und Immunpräzipitation 27

Gelelektrophorese 29

Nachweismethoden für Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen 31

Proteinisolierungen 32

Isolierung von Vimentin aus B16 Melanomazellen: Vergleich mit dem 59kd Protein 33

Inhibition der Glykosylierung und Glykosidaseverdau zellulärer Proteine 35

Zellfraktionierung und differentielle Extraktion 36

Experimente zur Modulation der Expression des NORM-2 Antigens 40

ERGEBNISSE 43-72

Lokalisierung des NORM-2 Antigens auf der Oberfläche von B16 Melanomazellen 43

Biochemische Identifizierung des NORM-2 Antigens als ein Zelloberflächen-Glykoprotein 46

Biochemische Identifizierung des NORM-2 Antigens als ein integrales Membranprotein 51

Subzelluläre Verteilung des NORM-2 Antigens 55

Abhängigkeit der Antikörperbindung von der Konformation des NORM-2 Antigens 55

Isolierung des 83kd Proteins 59

Abhängigkeit der NORM-2 Antigenexpression vom Wachstumszustand der B16 Melanomazellen 62

Modulierung der NORM-2 Antigenexpression durch "transforming growth factor-ß" (TGF-ß) 66

Vorkommen des NORM-2 Antigens auf verschiedenen Zellinien: Koexpression mit Rezeptoren für TGF-ß und NGF 70

DISKUSSION 73-87

Identifizierung und Charakterisierung des 105/83kd NORM-2 Antigens 73

Bedeutung des 105/83kd Glykoproteins in der Wachtumsregulation 78

Weitere experimentelle Vorhaben 86

LITERATURVERZEICHNIS 88-104

LEBENSLAUF

ABKÜRUZUNGEN

cpm	gezählte radioaktive Zerfälle pro Minute
cDNS	komplementäre DNS
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EndoF	Endoglykosidase F
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin-gamma
MG	Molekulargewicht
NEM	N-Ethylmaleinimid
NGF	nerve growth factor
	Nerven Wachstumsfaktor
PBS	phosphatgepufferte Saline
PDGF	"platelet-derived" Wachstumsfaktor
RNS	Ribonukleinsäure
RSV	Rous Sarcoma Virus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-ß	transforming growth factor-ß
	transformierender Wachtumsfaktor-ß
Upm	Umdrehungen pro Minute

ZUSAMMENFASSUNG

Der funktionelle monoklonale Antikörper NORM-2 wurde in früheren Arbeiten des Labors durch syngene Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit Bl6 Melanomazellen gewonnen. Die Behandlung der Bl6 Zellen mit diesem Antikörper führte zur Wachtumshemmung der Tumorzellen in der Gewebekultur und in syngenen Mäusen. Der hemmende Effekt der NORM-2 Antikörper konnte als Reversion des transformierten Phänotyps von Bl6 Melanomazellen interpretiert werden (Vollmers, H.P., Imhof, B.A., Wieland, I., Hiesel, A., and Birchmeier, W.; Cell 40, 547-557).

In dieser Arbeit wurde das Antigen, über welches der NORM-2 Antikörper die Reversion des transformierten Phänotyps bewirkt, als ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 83kd (unter reduzierenden Gelbedingungen) und 105kd (unter nicht reduzierenden Gelbedingungen) charakterisiert. Dieses Glykoprotein hat einen isoelektrischen Punkt von 4,3 - 5,1 und ist als integrales Membranprotein auf der Oberfläche von Bl6 Melanomazellen verankert. Das Antigen konnte auch auf der Oberfläche humaner Melanomazellen und auf Neuroblastomazellen der Maus, jedoch nicht auf 3T3 Fibroblasten, nachgewiesen werden. Nach der Abspaltung N-glykosidisch gebundener Zuckerreste beträgt das Molekulargewicht des NORM-2 Antigens 72kd. Dieses Proteingerüst wird immer noch vom NORM-2 Antikörper erkannt. Reduzierende und denaturierende Agenzien zerstören dagegen die antigene Determinante. Wahrscheinlich ist die native Konformation des NORM-2 Antigens Voraus-

setzung für die Erkennung durch den monoklonalen Antikörper. Das 83kd Glykoprotein konnte aus B16 Melanomazellen durch präparative Immunpräzipitation und anschließender Elektroelution aus präparativen SDS-Polyacrylamidgelen zur Homogenität gereinigt werden.

Interessanterweise ist die Expression des 105/83kd Glykoproteins proliferationsassoziiert und vom Wachstumszustand der B16 Melanomazellen abhängig. Im Vergleich zu proliferierenden B16 Zellen ist die NORM-2 Antigenmenge in wachtumsgehemten Zellen auf ein Zehntel reduziert. Nach der Serumstimulierung wachtstumsinhibierter B16 Zellen wird das NORM-2 Antigen im Verlauf der DNS-Synthesephase reexprimiert. Die Bindung des NORM-2 Antikörpers an die während der G0/G1 Phase exprimierten 105/83 kd Oberflächenantigene blockiert anscheinend das Eintreten der B16 Zellen in die DNS-Synthesephase. Dagegen führt die Behandlung von B16 Melanomazellen mit dem wachtumsinhibitorischen Faktor TGF-ß zur spezifischen Herunterregulierung der Biosynthese des 105/83kd Glykoproteins.

Aufgrund der biochemischen Eigenschaften und der zellphysiologischen Dynamik des 105/83kd Glykoproteins kann angenommen werden, daß es einen Rezeptor für einen stimulierenden oder inhibierenden Wachstumsfaktor darstellt. Auf jeden Fall weisen die Resultate daraufhin, daß das NORM-2 Antigen eine wichtige Funktion bei der Wachtumsregulation der B16 Melanomazellen in_vitro und in_vivo ausübt.

Durch die Proliferation und Differenzierung weniger prädeterminierter Zellen werden in der Ontogenese multizellulärer Organismen eine Vielfalt morphologisch, physiologisch und biochemisch verschiedener Zellarten erzeugt. Die Proliferation und die Differenzierung folgen präzisen Regeln, die eine normale Embryonalentwicklung und die Aufrechterhaltung lebenswichtiger Funktionen im adulten Organismus garantieren. Die Differenzierung führt zur Festlegung charakteristischer Merkmale, welche die entsprechenden Zellen auszeichnen, und endet im allgemeinen mit Wachstumsstillstand der ausdifferenzierten Zellen. Nur unter gewissen Umständen, zum Beispiel in den regenerativen Prozessen der Wundheilung, kann diese Wachstumsinhibition kurzfristig reversibel werden.

Tumorzellen haben diese normalen Wachstumsregeln durchbrochen. Die Integration der Tumorzellen im normalen Gewebeverband ist aufgehoben, die Zellen teilen sich unkontrolliert und beeinträchtigen durch Expansion die normalen Funktionen des umgebenden Gewebes.

Wie entstehen Tumorzellen?

Die Entwicklung von der Normalzelle zur Tumorzelle ist gewöhnlich ein langwieriger Vorgang. Eine notwendige Voraussetzung ist die Transformation zu autonomem Wachstum und zur potentiellen Unsterblichkeit. In den letzten Jahren wurde eine Reihe viraler und zellulärer

Gene identifiziert, die Onkogene, die für die neoplastische Transformation verantwortlich gemacht werden. In der nächsten Stufe der Tumorgenese müssen sich die transformierten Zellen im Organismus erfolgreich etablieren. Im Verlauf der Tumorprogression kommen also auch modulierende Eigenschaften zum Tragen, die an sich nicht für den neoplastischen Zustand verantwortlich sind, sondern die Tumorausbreitung begünstigen. Dazu zählen die Fähigkeit der Zellen zur Invasion und Metastasierung und der erfolgreiche Schutz vor dem Immunsystem (Bishop, 1985; Klein and Klein, 1985).

Die Transformation einer normalen zu einer neoplastischen Zelle kann auf verschiedene Weise, zum Beispiel durch Karzinogene, durch Strahlen und durch Tumorviren, erfolgen. Die Transformation durch DNS- und RNS-Tumorviren wurde besonders intensiv untersucht. DNS-Tumorviren integrieren ihre DNS ins Genom bestimmter Wirtszellen und bewirken durch die Expression ihrer viralen Proteine die Transformation der betroffenen Zellen. In SV40-transformierten Zellen ist zum Beispiel die Funktion des virusspezifischen T-Antigens wichtig für die Initiation und Aufrechterhaltung des transformierten Zustands (Tooze, 1980). Als erstes retrovirales Onkogen wurde das src-Gen des Rous Sarkoma Virus (RSV) identifiziert. Wie alle anderen RNS-Viren kann das RSV erst nach der reversen Transkription seiner RNS in DNS in das Genom der Wirtzelle integrieren. In RSV-infizierten Hühnern entwickeln sich Sarkome, und Fibro-

blasten werden in Kultur durch das Retrovirus transformiert. Das src-Onkogen des RSV ist jedoch kein echtes virales Gen, vielmehr existieren im Genom der Vertebraten dazu zelluläre Homologe (Stehelin et al., 1976). Inzwischen sind über zwanzig verschiedene Onkogene bekannt, die durch die retrovirale Transduktion normale Zellen transformieren können. Von den meisten wurde das nichtonkogene, zelluläre Homolog, das Proto-Onkogen, identifiziert (Bishop, 1985). Dabei zeigte sich, daß die viralen Onkogene in ihrem molekulargenetischen Aufbau von den zellulären Proto-Onkogenen abweichen. Das src-Gen des RSV unterscheidet sich zum Beispiel durch Punktmutationen und durch eine völlig verschiedene Sequenz am 3'Ende vom zellulären src-Gen. Diese Veränderungen lassen sich letztlich auch im Genprodukt, der Tyrosinkinase $pp60^{src}$, feststellen.

Die Onkogenprodukte repräsentieren eine Vielfalt verschiedener Proteine, die sich jedoch allesamt durch eine Deregulierung in ihrer Aktivierung oder Expression von den nichtonkogenen Homologen unterscheiden. Einige zelluläre Proto-Onkogenprodukte werden in den regulierten Prozessen der Wachstumsstimulierung normaler Zellen in einem präzisen Muster exprimiert. Es ist daher nicht erstaunlich, daß Fehlsteuerungen in dieser Kaskade, ausgehend von der Bindung eines Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor bis hin zur Übertragung des Signals in den Zellkern, zur neoplastischen Transformation führen können. Tatsächlich sind Tumorzellen im Gegensatz zu normalen Zellen häufig unabhängig von spezifischen Wachstumsfaktoren, etwa indem sie ihre

eigenen Wachstumsfaktoren produzieren und sich auf autokrine Weise selbst im Wachstum stimulieren können (Sporn and Roberts, 1985; Rosenthal et al., 1986). Es zeigte sich, daß in einigen untersuchten Fällen diese endogen gebildeten Stimulatoren Ähnlichkeit mit dem "platelet derived" Wachstumsfaktor haben, der auch in der Proliferation normaler Zellen eine Rolle spielt (Betsholtz et al., 1983; Heldin and Westermark, 1984; Westermark et al., 1986). Viele virustransformierte Zellen synthetisieren den transformierenden Wachstumsfaktor-α (TGF-α), der über die Bindung an den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) ihre Zellproliferation anregt (Marquardt et al., 1983). Eine andere Ursache für die autonome Proliferation neoplastischer Zellen liegt auch häufig in der konstitutiven Aktivität eines Rezeptors in Abwesenheit des spezifischen Liganden. Das erbB Onkogenprodukt repräsentiert zum Beispiel eine verkürzte Variante des EGF-Rezeptors, und das nahe verwandte neu-Onkogenprodukt p185 wurde wahrscheinlich durch eine einzige Punktmutation in daueraktivierten Zustand versetzt (Downward et al., 1984; Bargmann et al., 1986). Die Kaskade der Wachstumsstimulierung kann nun auch bei der intrazellulären Übertragung des Signals von der Zellmembran in den Zellkern entkoppelt sein. An der intrazellulären Seite der Plasmamembran sind die Onkogenprodukte des ras- und src-Onkogens lokalisiert, die wahrscheinlich in normalen Zellen zur Amplifikation eines Rezeptorsignals beitragen (Feramisco et al., 1984; Sugiomoto et al., 1984; Wakelam et al., 1986). Die Produkte des myc- und fos-Onkogens

kommen dagegen im Zellkern vor. Dort werden sie normalerweise in Antwort auf die Stimulierung einer Zelle mit Wachstumsfaktoren exprimiert, und vermutlich ist ihre Aufgabe im Zellkern die Aktivierung weiterer proliferationsassoziierter Gene (Amerlin et al., 1984; Müller et al., 1984; Curran et al., 1984). Die konstitutive Expression der fos- und myc-Proteine kann also zum selben Resultat führen, wie die Stimulierung einer Zelle über die reguläre Wachstumsfaktor-Rezeptor-Kaskade. Die Überexpression des myc-Onkogenprodukts tritt relativ häufig in lymphoiden Tumoren auf (Klein, 1983). Zur Transformation primärer Fibroblasten der Ratte reicht jedoch die permanente Überexpression des myc-Onkogens nicht aus. Primäre Fibroblasten müssen zwei kooperierenden Onkogenen, etwa dem myc-Onkogen und einem Onkogen der ras Familie, ausgesetzt werden, um sie vollständig zu transformieren. Die Notwendigkeit kooperierender Onkogene für die Transformation reflektiert schließlich den mehrstufigen Prozess der Karzinogenese, in der nacheinander verschiedene Gene aktiviert werden. Einige Gene, wie das myc-Onkogen, scheinen dabei für die Immortalisierung der Zellen notwendig zu sein, während andere, wie das ras-Onkogen, später in der Transformation wirken (Land et al., 1983). Inzwischen verstärken sich die Hinweise, daß in den mehrstufigen Prozessen der Transformation durch virale oder zelluläre Onkogene auch eine Inaktivierung der wachtsstumshemmenden "feedback"-Kontrolle normaler Zellen involviert sein könnte (Sporn and Roberts, 1985).

Wie bereits erwähnt besitzen transformierte Zellen nicht unbedingt die Fähigkeit, einen Tumor im Organismus zu bilden. Dazu bedarf es weiterer Eigenschaften, die das Überleben und die Ausbreitung der Tumorzellen ermöglichen. Im Verlauf der Progression erwerben neoplastische Zellen die Fähigkeit, in umliegendes Gewebe einzuwandern und in Körperregionen vorzudringen, die weit entfernt vom Ausgangs- oder Primär-Tumor sein können. Es hat sich gezeigt, daß viele verschiedene Faktoren, zum Beispiel proteolytische Enzyme, Tumor-Angiogenese-faktoren und verschiedene Zelloberflächenmoleküle, wie zum Beispiel Laminin, Fibronektin und die Histokompatibilitäts-Antigene (MHC), bei der Invasion und Metastasierung der Tumorzellen von Bedeutung sind (Nowell, 1986). Diese neuen Eigenschaften werden wahrscheinlich sequentiell von einzelnen Vorläufern in einer Tumorzellpopulation erworben, die schließlich zu einem neoplastischen Klon expandieren. Das Konzept der klonalen Evolution in einer Tumorzellpopulation beinhaltet, daß nur die wenigen mutierten Tumorzellen, die Selektionsvorteile aufweisen, expandieren und sich als dominierende Subklone in der Tumorzellpopulation durchsetzen (Nowell, 1986).

Die Entstehung von Metastasen beruht auf einer komplizierten Abfolge verschiedener Ereignisse. Der erste Schritt ist das Einbrechen des Primärtumors in das umliegende, gesunde Gewebe. Dabei ist sicherlich die Produktion proteolytischer Enzyme, welche die umgebende Matrix der basalen Membran lokal auflösen, beteiligt. Maligne Krebszellen lösen sich vom Primärtumor ab,

dringen in die Gefäße ein und werden im Lymphsystem oder über den Blutkreislauf in andere Körperregionen transportiert. Dabei gehen die meisten dieser zirkulierenden Krebszellen jedoch zugrunde, und wahrscheinlich überleben nur diejenigen, die mit sich selbst und mit verschiedenen Zellen im Blut oder mit dem vaskulären Endothel aggregieren können. Diese metastasierenden Zellen können die Gefäßewände durchwandern, sich im darunterliegenden Gewebe ansiedeln und eine Tochtergeschwulst oder Metastase bilden (Nicolson, 1982). Für die erfolgreiche Etablierung der Metastasen ist die Versorgung mit Blutgefäßen erforderlich. In diesen Prozessen der Neovaskularisierung sind angiogenetische Faktoren, die von den Tumorzellen selbst gebildet werden können, von Bedeutung (Folkman, 1975). Beim Menschen und auch in experimentellen Tiersystemen neigen viele Primärtumoren dazu, in bestimmten Organen preferentiell Metastasen zu bilden. Zum Beispiel metastasieren Brustkarzinomzellen vor allem im Gehirn und in der Lunge, und Metastasen von Melanomen kommen häufig im Gehirn, in der Lunge, in der Leber und in den Ovarien vor (Nicolson, 1982).

Ein weiteres Kriterium der Tumorentwicklung ist der Schutz der Tumorzellen vor dem körpereigenen Abwehrsystem. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit für eine effiziente Immunabwehr abhängig von der Art der Tumorinduktion. Da DNS-Tumorviren ihre eigenen transformierenden Gene besitzen, für die keine zellulären Homologe bekannt sind, stellen sie den besten Angriffs-

punkt für das Immunsystem dar. Tumore, die durch DNS-Tumorviren induziert wurden, entwickeln sich deshalb nur unter gewissen Umständen, zum Beispiel bei Krebspatienten, die unter einer schweren Form der kongenitalen oder erworbenen Immunschwäche (AIDS) leiden (Saemundsen et al., 1981). Ein größeres Problem für das Immunsystem sind dagegen jene Tumorzellen, die durch retrovirale oder nichtvirale Mechanismen transformiert wurden. Ihre Onkogenprodukte sind oft gar nicht oder nur schwach veränderte zelluläre Proteine (siehe oben), das heißt, sie unterscheiden sich nur unwesentlich von "Selbststrukturen" und repräsentieren deshalb keine effizienten Antigene. Dererlei neoplastische Zellen werden, wenn überhaupt, wahrscheinlich von den "natürlichen Killerzellen" (NK-Zellen) des Immunsystems angegriffen. NK-Zellen erkennen und elimieren vermutlich "falsch plazierte" Zellen, die aus ihrer natürlich bestimmten Umgebung ausgebrochen sind (Hanna and Burton, 1981). Tumorzellen, die eine reduzierte Expression der Selbsterkennungs-Antigene des MHC auszeichnet, sind zwar vor den Angriffen zytotoxischer T-Zellen weitgehend geschützt, können aber durch NK-Zellen eliminiert werden (Dalinas et al., 1982). Das körpereigene Immunsystem bietet also einen gewissen, aber offensichtlich nicht ausreichenden Schutz vor malignen Zellen.

Wie können Tumorzellen gehemmt werden?

Eines der wichtigsten Probleme der Krebsforschung ist, wie Tumorzellen in ihrem Wachstum gehemmt werden können, oder wie sie sogar derart beeinflußt werden könnten, daß sie Eigenschaften normaler Zellen wieder annehmen. Von außen können Tumorzellen durch Wachstumsinhibitoren oder durch Antikörper, die spezifische Zelloberflächen-Strukturen erkennen im Wachstum gehemmt werden. Daß Tumorzellen tatsächlich "normalisiert" werden können zeigten Experimente, in denen Tumorzellen mit normalen Zellen fusioniert wurden, und in denen die resultierenden somatischen Zellhybride zumindest am Anfang phänotypisch nicht tumorigen waren (Sager, 1985). Im Verlauf der Passage dieser Hybride entstehen durch Chromosomenverlust wieder tumorigene Segreganten. Anscheinend verhält sich also in supprimierten Hybriden die Tumorigenizität rezessiv, das heißt, es müssen spezifische Gene existieren, deren Produkte die transformierenden Eigenschaften der Tumorzellen unterdrücken können. Es wurde gezeigt, daß bekannte virale oder zelluläre Onkogene in ihrer Aktivität supprimiert werden, wenn transformierte Zellen mit normalen Zellen fusioniert wurden (Sager, 1985). Zum Beispiel wird in Zellhybriden aus RSV-transformierten und nicht-transformierten Nierenzellen der Ratte die Tanskription der viralen RNS, und damit die Expression der Tyrosinkinase $pp60^{src}$, reduziert (Dyson, Quade, Wyke, 1982). Nach der Fusion von SV40- oder ras-transformierten 3T3 mit normalen 3T3 Fibroblasten erfolgt die Suppression des transformierten Phänotyps auf der posttranslationalen

Ebene, denn in beiden Fällen wird das Onkogenprodukt, das T-Antigen des SV40, beziehungsweise das $p21^{ras}$-Protein, von den phänotypisch normalen Zellhybriden hergestellt (Howell and Sager, 1982; Sager, 1985). Die Suppressor Gene werden deshalb in Analogie zu den Onkogenen als Anti-Onkogene bezeichnet. Über den Mechanismus der Suppression in derartigen Fusionsexperimenten ist jedoch bisher wenig bekannt. Mögliche Prinzipien könnten in der Konkurrenz zwischen den Genprodukten normaler und mutanter Allele zu suchen sein. Andererseits könnten trans- wirkende Faktoren der normalen Fusionspartner zur Blockierung der Onkogenaktivität führen.

Möglicherweise handelt es sich bei einigen Suppressor-Genprodukten um bereits bekannte Faktoren, etwa um die endogen gebildeten inhibitorischen Wachstumsregulatoren (Chalone). Verschiedene Chalone wurden aus unterschiedlichen Geweben oder aus konditionierten Medien epithelialer und fibroblastischer Zellinien isoliert. Meistens handelt es sich um Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 10 - 50 kd. Chalone zeichnen sich nun dadurch aus, daß sie streng gewebs- oder zellspezifisch reagieren, keine Spezies-Spezifität zeigen, und ihre hemmende Wirkung auf die Proliferation der Zellen reversibel ist (Houck and Attallah, 1975). Obwohl Chalone bereits 1916 von Schäfer beschrieben wurden, sind erst wenige gut erforscht. Aus konditioniertem Medium dichte-arretierter 3T3 Fibroblasten wurde der Fibroblasten-Wachstumsregulator FGR isoliert (Hsu and

In unserer Arbeitsgruppe wurden in den letzten Jahren funktionell aktive Antikörper hergestellt, welche das Verhalten verschiedener Zellen beeinflussen können (Vollmers and Birchmeier, 1983; Imhof et al., 1983; Goodman et al., 1985). Die NORM-Antikörper üben einen normalisierenden Effekt auf Tumorzellen aus. Es konnte gezeigt werden, daß diese Antikörper das Wachstum von Bl6 Melanomazellen sowohl in der Gewebekultur als auch in syngenen Mäusen hemmen (Vollmers et al., 1985). Selbst die komplexen Vorgänge der Zellproliferation sind also mit Hilfe funktionell aktiver Antikörper manipulierbar.

Identifizierung und Charakterisierung des 105/83kd NORM-2 Antigens

Von großem Interesse war die biochemische Untersuchung jener Strukturen, über welche die NORM-Antikörper ihre hemmende Wirkung vermitteln. Ich habe mich mit der Identifizierung und Charakterisierung des NORM-2 Antigens befaßt. Mit Hilfe immun-biochemischer Methoden wurde das NORM-2 Antigen als ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 105/83 kd identifiziert, das auf der Zelloberfläche von Bl6 Melanomazellen lokalisiert ist. Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung weist daraufhin, daß das NORM-2 Antigen kein Hauptprotein auf der Oberfläche der Bl6 Melanomazellen ist. Ausgebreitete Bl6 Zellen sind zum Beispiel sehr schwach gefärbt. Tatsächlich konnte das NORM-2 Antigen am besten unter

siblen phänotypischen Transformation induzieren (DeLarco und Todaro, 1978). TGF-ß alleine ist ein multifunktioneller Faktor, der ein weites Spektrum verschiedener Zellen unterschiedlich beeinflussen kann. Je nach Zellart und Mikromilieu wirkt er stimulierend oder inhibierend auf die Proliferation oder Differenzierung (Roberts et al., 1985; Sporn et al., 1986). Die meisten epithelialen Zellen, und häufig auch die davon abstammenden Tumorzellen, werden im allgemeinen durch TGF-ß im Wachstum gehemmt, während mesenchymale Zellen je nach der Gesamtwachstumssituation gehemmt oder stimuliert werden. Viele verschiedene Gewebe und Zellen, ob normal oder transformiert, produzieren TGF-ß. Inzwischen ist die Bedeutung des TGF-ß in den autokrinen und parakrinen Mechanismen der Proliferationskontrolle unumstritten (Sporn and Roberts, 1985). In verschiedenen normalen Zelltypen blockiert TGF-ß die mitogene Wirkung stimulierender Wachstumsfaktoren, zum Beispiel produzieren aktivierte T-Lymphozyten neben Wachtumsstimulatoren auch TGF-ß. Wahrscheinlich ist TGF-ß in diesem Fall bei der negativen "feedback"-Kontrolle der klonalen Expansion von Bedeutung. In einigen Fällen hat es sich nun auch gezeigt, daß maligne Zellen die Fähigkeit verloren haben, sich durch TGF-ß auf autokrine Weise selbst zu hemmen. Die humane Lungenkarzinoma-Zellinie A549 sezerniert zwar große Mengen an TGF-ß, jedoch in einer inaktiven Form. Aktiver TGF-ß hemmt die Proliferationsfähigkeit der Zellen (siehe Sporn et al., 1986). Anscheinend ist also in A549 Zellen die normale "feedback"-Kontrolle, die ähnlich derjenigen von T-

Lymphozyten sein könnte, gestört. In Verbindung mit der Proliferationshemmung kann TGF-ß auch eine differenzierende Wirkung ausüben (Masui et al., 1986). Dieser Aspekt wurde zwar hauptsächlich bei normalen Zellen untersucht, könnte aber auch für die Reversion des transformierten Phänotyps durch Differenzierung neoplastischer Zellen an Bedeutung gewinnen. In die TGF-ß Polypeptid-Familie gehören der autokrine Wachstumsinhibitor BSC-1, der wahrscheinlich identisch, zumindest aber nahe verwandt mit TGF-ß ist (Tucker et al., 1984), und das Inhibin, das in der Hirnanhangdrüse die Sekretion des folikelstimulierenden Hormons inhibiert und auch das Wachstum humaner Ovarialkrebszellen im experimentellen Maussystem hemmt (Mason et al., 1985).

Obwohl mit Hilfe der Wachtumsinhibitoren einige bedeutende Fortschritte in der Krebsforschung erzielt wurden, ist das Spektrum der bisher bekannten Inhibitoren hinsichtlich ihrer wachstumshemmenden Wirkung auf relativ wenige Tumorzellen begrenzt. Sicherlich ist es notwendig noch weitere, vielleicht spezifischere, Inhibitoren zu finden. Ein schwerwiegendes Problem werden jedoch diejenigen Tumorzellen darstellen, die aufgrund einer Veränderung oder der fehlenden Expression des Rezeptors für einen Wachstumsinhibitor die Fähigkeit verloren haben, ein hemmendes Signal zu empfangen. Diese Tumorzellen werden auch auf entsprechende Inhibitoren nicht mit Wachstumsstillstand reagieren. Es stellt sich also die Frage, wie diese Tumorzellen anderweitig in ihrer Proliferationsfähigkeit negativ beeinflußt werden können.

Eine Lösungsmöglichkeit wurde mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gefunden, die in die Proliferationsvorgänge der Tumorzellen eingreifen. Die autokrine Stimulierung bestimmter Tumorzellen kann durch spezifische Antikörper gegen endogen produzierte Wachstumsfaktoren aufgehoben und infolgedessen das Wachstum gehemmt werden. Beispielsweise werden Osteosarkomazellen der Linie U-2, die sich mit ihrem selbsthergestellten "platelet-derived" Wachstumsfaktor (PDGF) autokrin stimulieren, durch anti-PDGF-Antikörper im Wachstum gehemmt (Betsholz et al., 1984). Ähnlich funktionieren auch Antikörper gegen das Interleukin-2 (IL-2), welche die autokrine Stimulierung IL-2 produzierender Leukämiezellen entkoppeln und zur Hemmung der Tumorzellproliferation führen (siehe Goustin et al., 1986). Andererseits können Antikörper um die Bindung eines Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor konkurrieren, in dem sie die Faktorbindungsstelle am Rezeptor blockieren und auf diese Weise das Wachstumssignal verhindern. Zum Beispiel inhibieren Antikörper gegen den Transferrin-Rezeptor das Wachstum von humanen Melanomazellen in vitro und in immundefekten, nackten Mäusen (Trowbrdige and Domingo, 1981). Desweiteren zeigten Masui et al. (1984), daß Antikörper, die mit dem Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors reagieren, das Wachstum von A431 Karzinomazellen in vitro und in vivo hemmen. Weinbergs Gruppe konnte zeigen, daß neu-transformierte Zellen durch Antikörper, die das p185 neu-Onkogenprodukt erkennen, im transformierten Phänotyp revertiert

werden. Diese anti-p185 Antikörper führen zur Herunterregulierung des permanent aktivierten p185-Rezeptors von der Zelloberfläche. Der Rezeptor wird also von seinem Wirkungsort entfernt, und einhergehend damit verlieren die neu-transformierten Zellen die Fähigkeit, in Agar zu wachsen (Debrin et al., 1985).

Die hier beschriebenen Fälle demonstrierten, daß die unkontrollierte Wachstumsstimulierung der Tumorzellen mit Hilfe spezifischer Antikörper unterbrochen werden kann. Andere Antikörper interferrieren dagegen mit jenen Mechanismen, welche für die Tumorprogression charakteristisch sind, zum Beispiel kann die Invasivität der Tumorzellen gehemmt werden (Harper und Reisfeld, 1983; Vollmers und Birchmeier, 1983; Steinemann et al., 1984; Sullivan und Quickley, 1986). Es besteht nun noch eine weitere Möglichkeit, mittels Antikörpern das Wachstum von Tumorzellen zu inhibieren. Spezifische Antikörper könnten über die Bindung an den Rezeptor für einen Inhibitor ein hemmendes Wachstumssignal an die Tumorzellen vermitteln. Obwohl diese Hypothese bisher nicht durch unmittelbare Daten unterstützt wird, kann sie aufgrund der Tatsache, daß es Antikörper gibt, die ein stimulierendes Signal vermitteln, in Erwägung gezogen werden. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß Antikörper gegen den Insulinrezeptor über ihre Bindung eine Insulinantwort in den entsprechenden Zellen auslösen können (Kahn et al., 1978). In Analogie dazu, könnten Antikörper gegen einen Inhibitor-Rezeptor die Hemmung der Proliferation von Tumorzellen hervorrufen.

Problematik und Ziel dieser Arbeit

Wie können wachstumshemmende Antikörper gefunden werden? Verschiedene Arbeitsgruppen haben unterschiedliche Methoden zur Identifizierung tumorhemmender Antikörper angewandt. In unserer Arbeitsgruppe wurde folgende Strategie gewählt: Mäuse wurden syngen mit Bl6 Melanomazellen immunisiert, und mit Hilfe der Hybridomatechnik wurden monoklonale Antikörper hergestellt. Diese Antikörper wurden *in vitro* und *in vivo* auf die Hemmung des Tumorzellwachstums getestet. Auf diese Weise wurden die zwei monoklonalen Antikörper NORM-1 und NORM-2 identifiziert (Vollmers et al., 1985). Beide NORM-Antikörper hemmen das substratunabhängige (anchorage independent) Wachstum von Bl6 Melanomazellen in Weichagar. Im Gegensatz zu vielen Tumorzellen können nichttumorigene Zellen gewöhnlich keine Kolonien in Agar bilden. Deshalb wird Agarwachstum häufig als Kriterium für die Tumorgenizität eingesetzt (Shin et al., 1975). In diesem Kontext wurden die Effekte der NORM-Antikörper als eine "Normalisierung" der Bl6 Melanomazellen interpretiert. Diese Hypothese fand auch dadurch Unterstützung, daß NORM-behandelte Bl6 Melanomazellen im Vergleich zu unbehandelten einen erhöhten Serumbedarf zeigen. *In vivo* wurden die NORM Antikörper in einem experimentellen Metastasesystem der Maus getestet. Dabei wurden hochmetastatische Subklone der Bl6 Melanomazellen in die Schwanzvene syngener Mäuse injiziert. Diese Tumorzellen siedeln sich letztlich preferentiell in der Lunge an und bilden dort melaningeschwärzte Tumorkolonien. Nach 10 - 12 Tagen wurden die Mäuse getötet, die Lungen heraus-

präpariert und auf Metastasen untersucht. Für die Antikörpertherapie wurden den Versuchstieren 3 Tage nach der Tumorzellinjektion gereinigte NORM-1 oder NORM-2 Antikörper gespritzt. Diese Tiere zeigten schon bei geringen Antikörpermengen (50 ug pro Maus) eine drastische Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es nun, das NORM-2 Antigen zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Aufgrund der funktionellen Effekte der NORM-2 Antikörper in vitro und in vivo wurde vermutet, daß er ein Antigen auf der Oberfläche von Bl6 Melanomazellen erkennt. Mit Hilfe immunzytochemischer Techniken sollte deshalb die zelluläre Lokalisation des NORM-2 Antigens bestimmt werden. Ebenfalls von großem Interesse war die Untersuchung der biochemischen Eigenschaften des NORM-2 Antigens wie Molekulargewicht, Glykosylierung und Multimerenbildung durch Disulfidbrücken, sowie seine proteinbiochemische Reinigung. Aufgrund der zellulären Lokalisierung und der biochemischen Charakterisierung des NORM-2 Antigens war es möglich, die Frage nach dem Mechanismus der Normalisierung durch den Antikörper zu stellen. Im Verlauf meiner Untersuchungen habe ich mich darauf konzentriert die Wirkungsweise des NORM-2 Antikörpers und die funktionelle Bedeutung des NORM-2 Antigens bei der Wachstumskontrolle von Bl6 Melanomazellen in vitro zu untersuchen.

Zellen und Zellkultur

Bl6 Melanomazellen der Maus wurden von M. Wabl, Tübingen erhalten. Die 3T3 Fibroblasten der Maus und humane WI38 Fibroblasten aus embryonaler Lunge stammten von Flow Laboratories. Die Neuroblastomalinie Neuro-2a und die Cloudman Melanomazellen der Maus, die humanen Linien MALME-3M Melanomazellen und SK-N-MC Neuroblastomazellen wurden von American Tissue Culture Collection gekauft. Die humane Melanomalinie A875 wurde freundlicherweise von M. Hosang, Basel zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden in Gewebekulturschalen (Falcon, Miles Scientific) bei 37°C und 10 % CO_2 gezüchtet. Das Standardkulturmedium setzte sich aus "Dulbecco's Modified Eagels Medium" (DMEM, Seromed), 10 % fötalem Kälberserum (Gibco) und 50'000 Einheiten Penicillin/Streptomycin (Seromed) zusammen. Die Zellen wurden gewöhnlich kurz vor Erreichen von Konfluenz auf frische Kulturschalen ausplattiert. Zur Passage wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Saline (PBS: 150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na_2HPO_4, pH 7,1) gewaschen und mit Trypsin-EDTA (2g Trypsin von Merck, 0,2 g EDTA, 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O, 0,1 g KH_2PO_4 pro Liter) abgelöst. Die Zellen wurden in frischem Kulturmedium aufgenommen und auf neue Gewebekulturschalen ausgesät. Nach 4 - 8 Wochen wurden frische Zellen aufgetaut. Dazu wurden die eingefrorenen Zellen in einem 37°C Wasserbad schnell aufgetaut, in 20 ml Kulturmedium gewaschen und für 5 Minuten bei 400 g und

$4^{o}C$ pelletiert. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und ausplattiert. Zum Einfrieren wurden etwa 1 x 10^{6} Zellen in 1,5 ml Einfriermedium (20 % fötales Kälberserum, 10 % Dimethylsulfoxid in DMEM) aufgenommen und sofort in 2 ml Einfrierröhrchen (Nunc) überführt. Die Röhrchen wurden in einem Styroporbehälter bei $-70^{o}C$ eingefroren und dann über flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Hybridomazellinien NORM-2, HB55 und HB11 wurden in Standardkulturmedium mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum gezüchtet. In den verschiedenen Experimenten wurden Kulturüberstände mit einer Antikörperkonzentration von 10 - 20 ug pro ml (von etwa 1 - 2 x 10^{6} Zellen) oder affinitätsgereinigte Antikörper eingesetzt. Die IgG2a produzierenden Hybridomalinien HB55 und HB11, welche humanes Ia Antigen bzw. H-2 $D^{b}K^{b}$ Strukturen erkennen stammen von American Type Tissue Collection.

Induktion von "capping" und Immunfluoreszenz von Zelloberflächen-Antigen

Verschiedene Oberflächenstrukturen der Zelle, z.B. Rezeptorproteine können durch einen spezifisch bindenden Liganden quervernetzt werden. Es bilden sich kleinere Aggregate, "patches", die sich zu größeren Aggregaten auf einen Pol der Zelle zusammenlagern und ein "cap" ausbilden (Bourguignon and Bourguignon, 1984). Gewöhnlich kann "capping" von Oberflächenproteinen nur an abgerundeten, nicht adherenten Zellen induziert

werden (Ash, Louvard, and Singer, 1977). Dementsprechend wurden B16 Melanomazellen mit Typsin-EDTA von der Kulturschale abgelöst. Die Zellen wurden in 50 ml Kulturmedium gewaschen und 2 x 10^6 Zellen wurden in 500 ul HEPES-gepuffertem NORM-2 oder HB55 Hybridomakulturüberstand resuspendiert. Alternativ dazu wurden affinitätsgereinigte Antikörper (1 - 10 ug pro ml) in HEPES-gepuffertem Kulturmedium eingesetzt. Die lebenden Zellen wurden für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Das "capping" wurde durch Inkubation für 10 Minuten bei 37°C induziert (Bouguignon and Singer, 1977). Anschließend wurden die Zellen dreimal in Kulturmedium gewaschen und mit fluoreszein-gekoppeltem polyklonalem Kaninchen-Anti-Maus Immunglobulin (1:200 verdünnt, von Miles Yeda) für weitere 30 Minuten auf Eis gestellt. Die gewaschenen Zellen wurden auf Objektträgern ausgestrichen, kurz luftgetrocknet und für 5 Minuten in Ethanol fixiert. Die Zellen wurden in PBS mit 10 % Kälberserum rehydriert (Kearny and Lawton, 1975) und in Moviol 4 - 88 (Hoechst) eingebettet.

Die Moviol-Lösung wurde nach Heimer und Taylor hergestellt: 6 g Glyzerin (p.a., Merck), 2,4 g Moviol- 4 - 88 (Hoechst) und 6 ml destilliertes Wasser wurden gut gemischt und 2 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Nach Zugabe von 12 ml 0,2 M Tris-Cl pH 8,5, wurde das Gemisch unter Rühren im Wasserbad bei 50°C für 30 Minuten inkubiert. Die visköse Lösung wurde bei 5'000 g für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand bei 4°C aufbewahrt.

B16 Melanomazellen, die auf Deckgläschen gewachsen waren, wurden wie die suspendierten Zellen mit der Immunfluoreszenz-Technik gefärbt. Jedoch wurden hier alle Schritte auf Eis durchgeführt. Zuletzt wurden die adhärierenden Zellen mit 3 % Formaldehyd in PBS für 10 Minuten fixiert und dann in PBS gewaschen. Die Proben wurden in Moviol 4 - 88 eingebettet. Die Präparate wurden mit einem Leitz Orthoplan Fluoreszenzmikroskop geprüft.

Indirekter Radioimmunassay an lebenden Zellen

Dieser Assay diente dem quantitativen Vergleich von exprimiertem NORM-2 Antigen auf der Oberfläche verschiedener Zellen. Gewöhnlich wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA von der Gewebekulturschale abgelöst. Um die Sensitivität des NORM-2 Antigens gegenüber Proteasen zu testen, wurden B16 Melanomazellen mit TPCK-Trypsin (Sigma) oder Papain (Sigma) auf der Kulturschale behandelt. Die abgelösten Zellen wurden in 50 ml Kulturmedium gewaschen (Papain wurde mit 4 mM N-Ethmylmaleinimid inaktiviert) und pro Probe wurden 2 x 10^6 Zellen mit 500 ul NORM-2 oder HB55 Hybridomakulturüberstand 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in 1 ml Medium dreimal gewaschen und mit ^{125}I-Ziege-Anti-Maus-Immunglobulin (5 x 10^5 cpm pro Probe; das Ziege-Anti-Maus IgG stammte von Jackson Laboratories) für eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die zellgebundene Radioaktivität in einem Packard-Gammazähler

gemessen. Jeder Ansatz wurde doppelt angelegt. Zur Bestimmung der spezifischen Bindung des NORM-2 Antikörpers wurden die HB55 Kontrollwerte abgezogen.

Bindungstest mit jodiertem "nerve growth factor" (NGF)

Die Bindung von "nerve growth factor" (NGF) an verschiedene Zellinien erfolgte nach der Methode von Schechter and Bothwell (1981). Die Zellen wurden zunächst mit 2 mM EDTA in PBS von der Gewebekulturschale abgelöst und in DMEM gewaschen. 4 x 10^5 Zellen wurden mit 10 ug ^{125}I-markiertem "nerve growth factor" (2 bis 4 x 10^7 cpm pro ug) in 200 ul DMEM mit 1 mg pro ml Serumalbumin bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 45 Minuten wurden 100 ul dieser Zellsuspension auf ein 200 ul Sucrosekissen geschichtet (10 % Sucrose in PBS mit 1 mg pro ml Serumalbumin; es wurden schlanke 0,4 ml Reaktionsgefäße eingesetzt). Dieser Ansatz wurde bei 12'000 g für 3 Sekunden zentrifugiert. Die Probe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, die Spitze des Probenröhrchens mit den pelletierten Zellen abgeschnitten und in einem Packard Gammazähler gemessen. Die unspezifische Bindung von ^{125}I-NGF wurde in Parallelansätzen mit einem tausendfachen Überschuß an nichtjodiertem NGF gemessen.

ELISA

Die Antikörperkonzentration verschiedener Hybridomakulturüberstände wurde im "enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) bestimmt. Eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Linbro, Flow Laboratories) wurde mit 10 ug

pro ml Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin (RAM 7 S, Nordic) in Boratpuffer, pH 8,2 (6,2 g Borsäure, 9,53 g Borax, 4,4 g NaCl pro Liter) über Nacht bei 4°C beschichtet. Diese Antikörperlösung wurde dann entfernt und freie Bindungsstellen am Plastik mit 1 % Serumalbumin in Boratpuffer bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach 30 Minuten wurde die Platte dreimal mit Puffer gewaschen, pro Vertiefung wurden 100 ul Hybridomakulturüberstand pipettiert und für weitere 6 bis 8 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit Boratpuffer wurde der zweite Antikörper, peroxidase gekoppeltes Kaninchen-Anti-Maus Immunglobulin (Dako, 1 : 100 verdünnt in Boratpuffer mit 1 % Serumalbumin), dazugegeben und für weitere 4 bis 6 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die freien Immunglobuline wurden anschließend weggewaschen und die gebundenen Antikörper durch die Peroxidasereaktion nachgewiesen. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe der Substratlösung gestartet (1 ml 0,5 M Phosphatpuffer, pH 6, 20 ul 30 % H_2O_2, 25 mg ortho-Phenylendiamin pro 100 ml; diese Lösung wurde kurz vor Gebrauch angesetzt und im Dunkeln gehalten). Die Reaktion wurde nach 3 bis 15 Minuten mit 50 ul 3N HCl gestoppt und die Proben im "Titertek Multiscan" (Flow Laboratories) bei 492 nm gemessen. Anhand der Standardwerte mit gereinigten Maus-Immunglobulinen wurde die Antikörperkonzentration in den Hybridomakulturüberständen berechnet.

Radioaktive Markierungen

Die Radiojodierung von gereinigtem Antikörper oder NGF wurde mit Hilfe des Glukoseoxidase-Laktoperoxidase-Systems von Medac durchgeführt. Die mitgelieferten Enzyme sind biotinyliert, damit man sie später abtrennen kann. In der Regel wurde für 10 ug Protein 1 mCi trägerfreies $Na^{125}I$ (Amersham) eingesetzt. Die Abtrennung von freiem Jod-125 erfolgte auf einer 2 ml G-25 Sephadex Säule, die mit 100 ul avidingekoppelter Sepharose 4 B überschichtet wurde (Gunniplex, Risse 1983). Die Säule wurde mit 5 % Serum in PBS äquilibriert, und die radioaktiv markierten Proteine wurden mit demselben Puffer eluiert. Die spezifische Aktivität der radiojodierten Proteine betrug 2 bis 4 x 10^7 cpm pro ug.

Die Jodierung lebender Zellen mit Hilfe der Laktoperoxidase erlaubt eine spezifische Markierung von Zelloberflächenproteinen. Bl6 Melanomazellen wurden nach einer veränderten Methode von Haustein (1975) radiojodiert. Dabei wurden die Zellen vorsichtig mit 2 mM EDTA in PBS von der Kulturschale abgelöst, einmal in DMEM und einmal in PBS gewaschen. 2 x 10^6 Zellen wurden in (50 ul) PBS mit 0,1 % Glukose aufgenommen. Die Jodierung mit 1 mCi trägerfreiem $Na^{125}I$ (Amersham) erfolgte mit Hilfe von 10 ul gelöster Laktoperoxidase (7,6 Einheiten pro ml; Sigma) und 10 ul H_2O_2 (0,03 % in PBS) bei 37°C für 5 Minuten. Die Verkürzung der Jodierungszeit auf 5 Minuten und eine Inkubationstemperatur von 37°C erwies sich schonender für die Zellen als das Protokoll von Haustein. Die jodierten

Zellen wurden zweimal in 800 ul eiskaltem DMEM und einmal in 800 ul kaltem PBS gewaschen. Das Zellysat wurde für Immunpräzipitationen eingesetzt.

Subkonfluent wachsende Zellen wurden in 10 cm Gewebekulturschalen mit jeweils 200 uCi der folgenden radioaktiven Metabolite markiert: ^{35}S-Methionin (1100 Ci pro mmol, Amersham), ^{35}S-Cystein (1'000 C pro mmol, New England Nuclear) oder ^{3}H-Leucin (147 Ci pro mmol, New England Nuclear). Routinemäßig erfolgte die Markierung für etwa 12 Stunden bei 37°C in DMEM, dem jeweils nur 10% der entsprechenden Aminosäuren zugesetzt wurde und das mit 10 % fötalem Kälberserum angereichert war. Um Glykoproteine zu markieren, wurden die Zellen in 400 uCi ^{3}H-Glucosamin (38,9 Ci pro mmol; New England Nuclear) für 12 bis 24 Stunden kultiviert. Das Markierungsmedium setzte sich in diesem Fall aus DMEM, das nur 1/5 der regulären Glukosekonzentration enthielt (0,8 g Glukose pro Liter), und 10 % fötalem Kälberserum zusammen. Die Lysate der markierten Zellen wurden für die Immunpräzipitation mit NORM-2 Antikörper weiterverwendet.

Zell-Lysis und Immunpräzipitation

Die radioaktiv markierten Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS gewöhnlich in 1 ml Triton X-100 Lysispuffer (1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 3 mM Na-Azid, 1 mM Phenylmethyl Sulfonylfluorid, 2 mM N-Ethylmaleinimid, 50 mM Tris-Cl pH 7,5) soweit notwendig mit einem Gummischaber von der Platte abgekratzt und 1 Stunde auf Eis extrahiert. In Experimenten, in denen der Einfluß

reduzierender Agenzien auf die NORM-2 Antigenstruktur untersucht werden sollte, wurde entweder in Abwesenheit von N-Ethylmaleinimid lysiert oder das Triton X-100 Lysat mit 2 mM Dithiothreitol (DTT) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das DDT wurde anschließend mit 8 mM N-Ethylmaleinimid 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Unlösliches Material wurde bei 12'000 g für 15 Minuten bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde vor der Immunpräzipitation mit 100 ul einer 10 %igen Suspension von formalinfixierten S.aureus für 4 bis 12 Stunden bei 4°C voradsorbiert (die S.aureus Suspension wurde entweder nach der Methode von Kessler, 1975, hergestellt, oder von BRL bezogen). Vor der Antikörperzugabe wurde der Triton X-100 Extrakt 1 Stunde bei 100'000 g zentrifugiert. Dieser Überstand wurde dann mit 100 ul NORM-2 oder HB55 Hybridomakulturüberstand, bzw. mit 5 - 10 ug gereinigtem Antikörper, für mindestens 5 Stunden bei 4°C inkubiert. Da beide monoklonale Antikörper vom IgG2a Isotyp sind und an Protein A von S.aureus binden, konnten die Antigen-Antikörper-Komplexe direkt mit 15 - 20 ul 10%iger S.aureus Suspension präzipitiert werden. Nach 15 Minuten bei 4°C wurden die Bakterienpartikel pelletiert und dreimal mit 1 ml NET-Puffer (500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 3 mM Na-Azid, 50 mM Tris-Cl, pH 8,5) der 1 % Triton X-100 und 1 mg pro ml Ovalbumin enthielt, gewaschen, und einmal mit Triton X-100 Lysispuffer resuspendiert und zentrifugiert (zentrifugiert wurde immer bei 8'000 g für 2 Minuten). Routinemäßig wurde das S.aureus Pellet in 40 ul SDS-Dissoziationspuffer (Laemmli, 1970: 100 mM Tris-Cl, pH

6,8, 2 % SDS, 4 mM EDTA, 2 % Mercaptoethanol, 20 % Glyzerin, 100 ng pro ml Bromphenolblau) bei 95°C für 3 bis 5 Minuten erhitzt. Immunpräzipitate, die unter nichtreduzierenden Bedingungen analysiert werden sollten, wurden in SDS-Dissoziationspuffer ohne ß-Mercaptoethanol erhitzt. Alle Proben wurden bei 8'000 g für 2 Minuten zentrifugiert und die überstände in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Masse erfolgte in SDS-Polyacrylamidenden nach Laemmli (1970). Das Sammelgel wurde aus 5 % Acrylamid und das Trenngel aus einem 5 bis 15 % Acrylamidgradienten hergestellt. Die elektrophoretische Auftrennung dauerte bei 30 mA konstanter Stromstärke 2,5 bis 3 Stunden, bei 6 mA konstanter Stromstärke etwa 15 Stunden. Als Standard für die Molekulargewichtsbestimmung wurden ^{14}C-markierte Markerproteine (New England Nuclear) verwendet: Kohlensäureanhydrase (30'000d), Ovalbumin (45'000d), Albumin aus Rinderserum (69'000d), Phosphorylase b (97'000d) und Myosin (200'000d).

Zur zweidimensionalen Auftrennung von Proteinen wurde die Methode von O'Farrell (1975) angewendet. Diese Methode beruht darauf, daß Proteine in der ersten Dimension in einem stabilen pH-Gradienten gemäß ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt werden. In der zweiten Dimension werden die Proteine dann entsprechend ihrem

Molekulargewicht separiert. Für die Isolelektrofokussierung (IEF) des 83 kd Antigens wurden die NORM-2 Immunkomplexe in 9,5 M Harnstoff, 2 % NP40, 2 % Ampholine (0,4 % SERVALYT 2-11, 1,6 % SERVALYT 4-7, Serva), 5 % ß-Mecaptoethanol 30 Minuten bei Raumtemperatur dissoziert und in einem Trägerampyltgradienten von pH 2 bis 11 mit einer Verstärkung im pH Bereich 4 bis 7 elektrofokussiert. Die 1 ml IEF-Röhrchengele wurden aus 9,16 M Harnstoff, 3.78 % Acrylamid, 0,2 % Bisacrylamid, 2 % NP40, 6,4 % SERVALYT 4-7, 0,1 % SERVALYT 2-11 hergestellt. Pro 10 ml Lösung wurden 10 ul 10 % Ammoniumpersulfat und 7 ul TEMED dazugegeben. Die frisch gegossenen Gele wurden mit 10 ul 8 M Harnstofflösung überschichtet, die nach der Polymerisation durch Dissoziationspuffer ausgetauscht wurde. Nach zweistündiger Äquilibrierung wurde der Puffer entfernt, die Proben aufgeladen, mit 9 M Harnstoff, 1% (w/v) Ampholine überschichtet und die Fokussierung gestartet. Die Proteine wurden bei 1 Watt konstanter Leistung für 5'600 - 6'000 Voltstunden aufgetrennt. Als Anodenpuffer wurde 0,01 M H_3PO_4, als Kathodenpuffer 0,02 N NaOH verwendet. Um den pH-Gradienten nach Beendigung der Elektrofokussierung zu bestimmen, wurden Kontrollgele in 1 cm Stücke geschnitten und in 0,5 ml Aqua dest. gequollen. Die pH-Werte der einzelnen Fraktionen wurden mit einem pH-Meter bestimmt.

Die Isolelektrofokussierung von Vimentin und 59 kd Protein erfolgte in einem Trägerampholyt-Gradienten von pH 3,5 bis 10 mit einer Verstärkung im pH Bereich 5 bis

7. Im Dissoziationspuffer und in den IEF-Röhrchengelen wurden die entsprechenden Ampholine (0,4 % Ampholine 5-7, 0,1 % Ampholine 3,5-10, LKB) eingesetzt.

Für die zweite Dimension wurden die Röhrchengele in SDS-Dissoziationspuffer 30 Minuten äquilibiert und danach mit 1 % verflüssigter Agarose (1 % Agarose, 2,3 % SDS, 62,5 mM Tris-Cl pH 6,8) auf 5-15 % Polyacrylamid-Gradientengele geschweißt. Die elektrofokussierten Proteine wurden dann ihrem Molekulargewicht entsprechend in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Nachweismethoden für Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen

Gelbanden mit einer Proteinkonzentration über 1 ug wurden durch die Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Gelbanden, deren Proteinkonzentration weniger als 1 ug betrug, wurden mit der Silberfärbung analysiert. Dazu wurden die Polyacrylamidgele in 50 % Methanol und 12 % Essigsäure über Nacht geschrumpft. Die Gele wurden zwei mal für 20 Minuten in Aqua dest. gewaschen und für 15 Minuten fixiert (2,5 % Glutaraldehyd, 1 % w/v $Na_2B_4O_4$ in Aqua dest.). Nach dem Fixieren wurden die Gele wieder gewaschen (dreimal für 20 Minuten) und für 20 Minuten mit der Silberlösung (zu 40 ml 0,09 N NaOH, 2,5 % NH_3 add 1,6 g Ag NO_3 in 8 ml Aqua dest., dann mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen) inkubiert. Die Gele wurden nochmals gewaschen und in der Reduktionslösung (25 ml Ethanol, 1,5 ml 1 % Zitronensäure, 70 ul 37 % Formaldehyd auf 250 ml) entwickelt. Sobald die gewünschte Intensität der Banden erreicht war, wurde mit

1 % Essigsäure abgestoppt.

Radioaktive Proteinbanden wurden in der Autoradiographie oder in der Fluorographie sichtbar gemacht. Bei jodierten Proben wurde das Gel nach der Coomassie-Färbung auf Whatman 3MM Papier mit Hitze und unter Vakuum getrocknet. Bei ^{3}H- und ^{35}S-markierten Proben wurden die Gele nach dem Entfärben für 15 Minuten in EN-LIGHTNING Gel-Scintilationsflüssigkeit (New England Nuclear) inkubiert und dann getrocknet. Die getrockneten Gele wurden auf Kodak X-AR oder Kodak X-SI Röntgenfilme gelegt. Die Filme wurden bei -70°C exponiert.

Proteinisolierungen

Zur grammweisen Züchtung von Bl6 Melanomazellen wurden Suspensionskulturen angelegt. Etwa 3,5 x 10^{7} subkonfluente Bl6 Zellen wurden in festverschlossenen Glasflaschen (250 ml) angesetzt und 3 Tage bei 37°C unter ständigem Schütteln (140 Upm) kultiviert. Aus vierzig solcher Schüttelkulturen wurden 10 g gepackte Zellen gewonnen, die zur Reinigung des 83 kd Proteins verwendet wurden. Die Zellen wurden in 300 ml Triton X-100 Lysispuffer (siehe unter "Immunpräzipitationen") im Homogenisator (Braun) bei 900 Upm aufgebrochen. Das Zellysat wurde eine Stunde auf Eis extrahiert und anschließend 10 Minunten bei 10'000 g und eine Stunde bei 100'000 g zentrifugiert. Jeweils 100 ml Lysat wurde mit 0,5 mg gereinigtem NORM-2 Antikörper bei 4°C inkubiert. Präzipitiert wurde dreimal hintereinander für 30 Minuten mit 200 ul S.aureus Suspension. Das S.aureus Pellet (180

ul) wurde dreimal mit 150 ml NET-Puffer und einmal mit 150 ml Lysispuffer (siehe Immunpräzipitationen) gewaschen und in 180 ul SDS-Dissoziationspuffer bei 95°C erhitzt. Das Eluat wurde in der präparativen SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Das unfixierte Gel wurde nach dem Lauf sofort in 4M Natriumazetatlösung gebadet. Bei dieser hohen Salzkonzentration fällt SDS als milchiger Niederschlag im Gel aus, nur die Proteinbanden bleiben dabei ausgespart (Higgins and Dahmus, 1978). Die 83 Kd Proteinbande wurde ausgeschnitten und im Isco Elektrodialysator in 1/10 Laemmli-Puffer bei 1 mA für 3,5 Stunden eluiert (die Elektroelution wurde von Matthias Kluge ausgearbeitet). Mit dieser Prozedur konnten aus 10 g Zellen gewöhnlich 6 - 7 ug 83 kd Protein gereinigt werden.

Isolierung von Vimentin aus Bl6 Melanomazellen: Vergleich mit dem 59 kd Protein

Vimentin wurde im wesentlichen nach der Methode von Franke et al. (1979) aus Bl6 Melanomazellen isoliert. Die Zellen wurden nach der radioaktiven Markierung mit ^{35}S-Methionin mit Triton X-100 Lysispuffer und durch Ultraschall lysiert. Das Zellysat wurde bei 12'000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal in Triton X-100 Lysispuffer und zweimal in 150 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$ extrahiert. Alle Zentrifugationen wurden bei 12'000 g und 4°C für 15 Minuten durchgeführt. Das Pellet wurde im obrigen Tris-Puffer aufgenommen und mit 0,5 mg pro ml DNase I (Sigma) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem

Zentrifugieren wurde in 0,6 M KCl, 10 mM Tris-Cl (pH 7,4) 1 Stunde auf Eis extrahiert, dann in 10 mM Tris-Cl pH 7,4, 1 mM EDTA gewaschen und über Nacht bei 4°C im selben Puffer inkubiert. Depolymerisiertes Vimentin konnte nach der Zentrifugation bei 100'000 g im Überstand gewonnen werden.

Proteine können durch partiellen Verdau auf ihre Verwandschaft hin untersucht werden. Cleveland et al. (1977) entwickelten eine Methode, bei der die Fragmentierung der Proteine durch Auftrennung der Peptide in der SDS-Gelelektrophorese analysiert wird. Das ^{35}S-methionin-markierte 59 kd Protein aus NORM-2 Immunpräzipitationen und isoliertes Vimentin wurden in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Polyacrylamidgel wurde in diesem Fall jedoch nur für 5 Minuten in 20 % Methanol und 7,5 % Essigsäure fixiert, sofort getrockent und über Nacht autoradiographiert. Anhand des Autoradiogramms konnte die gewünschte Proteinbande aus dem Gel ausgeschnitten werden. Die Gelstücke wurden in die Sammelgeltasche des "Clevelandgels" gesteckt und in 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, 0,125 M Tris-Cl (pH 6,8) äquilibriert. Dieser Puffer wurde gegen frischen Puffer ausgetauscht, der zusätzlich 10 % Glyzerin, 0,001 °/oo Bromphenolblau und 10 ng S.aureus_V8 Protease (Miles Scientific) enthielt, und die Elektrophorese wurde mit 30 mA gestartet. Sobald die Bromphenolblaufront das Trenngel, das aus einem 10 - 20 prozentigen Acrylamidgradienten bestand, erreicht hatte, wurde die Elektrophorese für 30 Minuten unterbrochen und somit der Protease-Verdau ein-

geleitet. Das Peptidmuster wurde nach der Fluorographie des Gels analysiert.

Inhibition der Glykosylierung und Gylkosidaseverdau zellulärer Proteine

Tunicamycin inhibiert die Ausbildung N-glykosidischer Bindungen zwischen Kohlenhydraten und dem Proteingerüst in der Biosynthese von Glykoproteinen. Mit ^{3}H-glucosaminmarkierten Bl6 Melanomazellen wurde die geringstmögliche Tunicamicinkonzentration, die eine zuverlässige Hemmung der Glykosylierung erlaubt, ausgetestet. Die Zellen werden mit 50 uCi pro ml ^{3}H-Glucosamin in Anwesenheit verschiedener Tunicamycinkonzentrationen für 8 Stunden bei 37°C markiert. Die gewaschenen Zellen wurden in 0,1 N NaOH solubilisiert und mit 10 % Trichloressig-

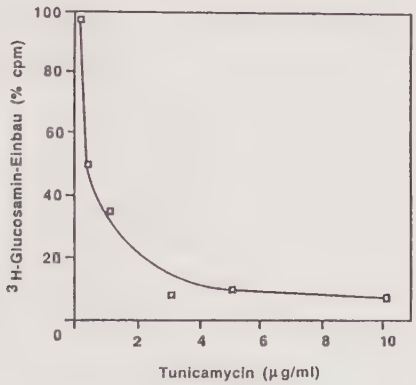


Abb. 1: Inkorporation von ^{3}H-Glucosamin in Abhängigkeit von der Tunicamycinkonzentration

Bl6 Melanomazellen wurden mit ^{3}H-Glucosamin in Anwesenheit von Tunicamycin metabolisch markiert. Die TCA-präzipitierbare Radioaktivität der Lysate wurde bestimmt.

säure auf Whatman GFC Filter gefällt. Die Filter wurden zweimal mit 10 ml 5 % TCA und einmal mit 10 ml Ethanol gewaschen, getrocknet und in Szintillationslösung (Biofluor, New England Nuclear) aufgenommen. Die Proben wurden im Szintilationszähler gemessen.

Die Inkorporation von ^{3}H-Glucosamin wurde bei einer Tunicamycinkonzentration von 3 ug pro ml um 90 % gehemmt (Abb. 1), ohne die Lebensfähigkeit der Zellen nennenswert zu beeinträchtigen. Diese Menge wurde in Markierungen mit ^{3}H-Leucin eingesetzt. Subkonfluente Bl6 Melanomazellen wurden mit 3 ug pro ml Tunicamycin (Sigma) für 30 Minuten bei 37^{o}C vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Anwesenheit von 3 ug pro ml Tunicamycin mit 100 uCi pro ml ^{3}H-Leucin für 5 Stunden bei 37^{o}C radioaktiv markiert. Die Zellen wurden lysiert und das Lysat für die Immunpräzipitation eingesetzt.

Die Kohlenhydrate des 83 kd NORM-2 Antigens wurden mit Endo-ß-N-Acetylglucosamindiase F (Endo F, Elder and Alexander, 1982) abgespalten. Endo F spaltet Glykane vom "high mannose" und vom komplexen Typ, die über Asparaginreste an das Protein gebunden sind. Für den Verdau mit Endo F wurde ^{3}H-Leucin markiertes NORM-2 Antigen immunpräzipitiert. Die S.aureus-Immunkomplexe wurden in 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH 7,4) gewaschen und in 50 ul 0,5 % N P40, 0,1 % SDS, 50 mM EDTA, 1 % ß-Mercaptoethanol, 0,1 M Na-Phosphat (pH 6,1) resuspendiert und für 3 Minuten bei 97^{o}C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 1 bis 2 Einheiten Endo F (New

England Nuclear) dazupipettiert. Im Kontrollansatz wurde das Enzym weggelassen. Das Gemisch wurde bei 37°C für 3 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 ul SDS-Dissoziationspuffer gestoppt und die Proben in der SDS-Gelelektrophorese und durch Fluorography analysiert.

Um ein extrazelluläres Fragment des 105/83 kd Proteins zu identifizieren, wurden ^{3}H-glucosamin-markierte Bl6 Melanomazellen auf der Kulturschale mit 0,1 mg pro ml Papain (Sigma) 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in Triton X-100 Lysispuffer (siehe Immunpräzipitation) extrahiert. Zum überstand wurde 4 mM N-Ethylmaleinimid zur Inaktivierung des Papains dazugegeben. Aus dem Überstand und dem Zellysat wurde dann mit NORM-2 Antikörper immunpräzipitiert. Das präzipitierte Material wurde durch SDS-Geleletrophorese und Fluorography analysiert.

Zellfraktionierung und differentielle Extraktion des NORM-2 Antigens

Um die Lokalisation des 105/83kd Proteins in einem subzellulären Organell oder im löslichen Cytoplasma festzustellen, wurde die differentielle Zentrifugation eingesetzt. Die Fraktionierung von ^{3}H-glucosamin- und ^{35}S-cystein-markierten Bl6 Melanomazellen wurden im Prinzip nach Curran et al. (1984) durchgeführt. Die radioaktiv markierten Zellen wurden zunächst in DMEM von der Kulturschale abgeschabt und in PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml 10 mM HEPES (pH 7,5) und 3 mM N-Ethylmaleinimid resuspendiert und für 20 bis 30

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die hyperplasmischen Zellen durch Pipettieren mit einer gezogenen Pasteurpipette und durch kräftiges Schütteln aufgebrochen, bis weniger als 10 % intakte Zellen durch Ausschluß von Trypanblau (4 Teile 0,5 % Trypanblau werden mit 1 Teil 4,25 % NaCl kurz vor Gebrauch gemischt) nachzuweisen waren. Zur Abtrennung der Kerne wurde 1 ml Homogenisat über 1 ml Fiquoll Paque (Pharmacia) geschichtet und bei 600 g für 20 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Die obere, leichtere Phase wurde vorsichtig abgenommen und 90 Minuten bei 100'000 g und 4 °C zentrifugiert. Das 600 g Pellet (Zellkerne), das 100'000 g Pellet (partikuläre Komponenten) und der 100'000g Überstand (lösliche Produkte) wurden jeweils im gleichen Volumen mit 1 % Triton X-100, 10 mM HEPES (pH 7,5) 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM Phenylmethyl Sulfonylfluorid und 1 mM N-Ethylmaleinimid für 1 Stunde auf Eis extrahiert. Aus den einzelnen Fraktionen wurde mit NORM-2 Antikörper und S.aureus immunpräzipitiert. Zur Bestimmung der Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen wurden 10 ul Portionen mit TCA gefällt und durch Szintilationszählung gemessen.

Zur differentiellen Extraktion des NORM-2 Glykoproteins wurden B16 Melanomazellen nach der Markierung mit ^{3}H-Glucosamin in 10 mM HEPES (pH 7,4), 2 mM N-Ethylmaleinimid und 1 mM Phenylmethyl Sulfonylfluorid von der Kulturschale abgekratzt. Die Zellen wurden durch Ultraschall aufgebrochen, das Zell-Homogenisat in Portionen aufgeteilt und unter den folgenden Bedingungen 30 Minuten auf Eis extrahiert: 10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM

NaCl, 1,7 M NaCl, 10 mM EDTA, 0,5 % Deoxycholat oder 1 % Triton X-100. Nach der Zentrifugation für 90 Minuten bei 100'000 g wurden die Überstände auf eine Endkonzentration von 1 % Triton X-100, 0,5 % Deoxycholat, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl und 10 mM HEPES (pH 7,4) eingestellt. Der Extrakt mit hoher Salzkonzentration wurde gegen diesen Puffer dialysiert. Die 100'000 g Pellets des HEPES- und des EDTA-Extrakts wurden ebenfalls in diesem Puffer aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis extrahiert. Die Extrakte wurden vor der Immunpräzipitation nochmals bei 100'000 g zentrifugiert.

Die Extrahierbarkeit des NORM-2 Antigens, welches auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, wurde mit Hilfe des indirekten Radioimmunassays untersucht. Das NORM-2 Antigen wurde mit NORM-2 Antikörper und ^{125}I-Ziege-Anti-Maus-Immunglobulin markiert und mit Triton X-100 Lysispuffer auf Eis herausgelöst (15 Minuten). In der Kontrolle wurde das Anti-H-2D^bK^b IgG2a der Hybridomazellinie HB11 als erster Antikörper eingesetzt. Die Extrakte wurden für 15 Minuten bei 12'000 g oder für 60 Minuten bei 100'000 g zentrifugiert. Die Radioaktivität in den Überständen und im Pellet wurde im Gammazähler gemessen.

Experimente zur Modulation der Expression des NORM-2 Antigens

Die Menge an exprimiertem NORM-2 Antigen wurde in den folgenden Experimenten einerseits mit Hilfe des indirekten Radioimmunassays an 2 x 10^6 B16 Melanomazellen, und andererseits durch Immunpräzipitation aus ^{3}H-glucosamin-markierten Zell-Lysaten gemessen. Für die Immunpräzipitaten wurden gleiche Mengen TCA-präzipitierbarer Radioaktivität eingesetzt.

Wachstumsinhibition von B16 Melanomazellen in serumfreiem Medium: Die Kultivierung bei niederen Serumkonzentration ist eine verbreitete Methode, um Zellen in ihrem Wachstum zu inhibieren. Die B16 Melanomazellen mußten für mehrere Tage in serumfreiem Medium gehalten werden, denn selbst geringe Serummengen (0,1 bis 0,5 %) genügten den Tumorzellen zur Proliferation. Die B16 Zellen wurden bei einer Dichte von 1 x 10^6 Zellen pro cm^2 in Standardkulturmedium ausplattiert. Sobald sich die Zellen an den Kulturschalenboden angeheftet hatten, wurde das Medium gegen serumfreies DMEM ausgetauscht. Die Zellen wurden 3 Tage lang bei täglichem Mediumwechsel kultiviert. Derart inhibierte Zellen wurden mit 0,1 % oder 10 % fötalem Kälberserum für 24 Stunden stimuliert und ihre NORM-2 Antigenmenge bestimmt.

Wachstumshemmung bei hoher Zelldichte: B16 Melanomazellen zeigen keine eigentliche Kontaktinhibition in "monolayer" Form, jedoch demonstrierten Einbauversuche

mit ^{3}H-Thymidin, daß sie bei einer hohen Zelldichte im Wachstum gehemmt werden. In diesen Experimenten wurden 1 x 10^{4} Bl6 Zellen pro cm^{2} ausplattiert und für 3 Tage kultiviert (= "density arrested cells"). Als Kontrolle wurden solche inhibierte Zellen für 24 Stunden auf eine fünffach größere Fläche replattiert (= subkonfluente Zellen), und ihre NORM-2 Antigenmenge wurde mit der Menge der gehemmten Zellen verglichen. Für die Immunpräzipitation wurden die dichten und die frisch replattierten Zellen für 24 Stunden mit ^{3}H-Glucosamin markiert.

Behandlung von Bl6 Melanomazellen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und NORM-2 Antikörper: Um den Einfluß verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Expression des NORM-2 Antigens zu studieren, wurden Bl6 Melanomazellen für eine Woche in 2 % Rinderserum gezüchtet und mit TGF-ß, EGF, PDGF, NGF und gereinigtem NORM-2 Antikörper oder mit einer Mischung dieser Komponenten für 48 Stunden behandelt. Für die Immunpräzipitation wurden die Zellen in Anwesenheit der Faktoren für 24 Stunden mit ^{3}H-Glucosamin markiert.

In einem Kurzzeitexperiment wurden trypsinierte Bl6 Melanomazellen für 15, 30, 60 und 120 Minuten in Anwesenheit von 10 ug pro ml NORM-2 Antikörper bei 37^{o}C in Suspension inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und die Menge des NORM-2 Antigens auf der Zelloberfläche durch Reinkubation mit NORM-2 Antikörper bei 4^{o}C im indirekten Radioimmunassay bestimmt.

Der Proliferationszustand der B16 Melanomazellen wurde durch den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die neusynthetisierte DNS bestimmt. B16 Zellen (1×10^{4}) wurden in "Costar" Platten mit 24 Vertiefungen ausgesät und für 3 Tage in serumfreiem DMEM kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 2 % Kälberserum stimuliert und zu verschiedenen Zeiten mit ^{3}H-Thymidin (1 uCi pro ml, 87 Ci pro mmol; Amersham) für 2 Stunden markiert. Die Zellen wurden mit 0,5 ml Trypsin-EDTA abgelöst und in 0,5 ml 0,5 % SDS, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl (pH 7,4) solubilisiert. Das Lysat wurde mit 1,5 ml eiskalter zehnprozentiger TCA-Lösung gemischt und 10 Minuten auf Eis gestellt. Das TCA-präzipitierbare Material wurde auf "Whatman GFC" Filter von freiem ^{3}H-Thymidin getrennt und die eingebaute Radioaktivität durch Scintillationszählung bestimmt.

Lokalisierung des NORM-2 Antigens auf der Oberfläche von Bl6 Melanomazellen

Aufgrund der funktionellen Effekte des monoklonalen Antikörpers NORM-2 wurde vermutet, daß das NORM-2 Antigen auf der Oberfläche von Bl6 Melanomazellen lokalisiert ist. Diese Hypothese wurde mit der Immunfluoreszenztechnik an lebenden Bl6 Melanomazellen getestet. Wenn frisch trypsinierte Bl6 Zellen kurzfristig mit NORM-2 Antikörper bei 37°C inkubiert und anschließend mit fluoreszeingekoppelten Anti-Maus-Antikörper gefärbt wurden, konnte die Bildung eines "caps" beobachtet werden (Abb. 2a). Das "capping" beruht auf der Aggregation von Antigen-Antikörperkomplexen an einen Pol der Zelle (Bourguignon and Bourguignon, 1984) und reflektiert eine mobile Verankerung des NORM-2 Antigens in der Plasmamembran. Bl6 Melanomazellen, die mit einem irrelevanten IgG2a inkubiert wurden, zeigten dagegen keine Färbung (Abb. 2b). Auf frisch attachierten und auf sich teilenden Zellen ist das NORM-2 Antigen in einem punktförmigen Muster auf der gesamten Zelloberfläche verteilt (Abb. 2 c,d,e,f). Eine ähnliche Verteilung des Antigens zeigten auch gespreitete Bl6 Melanomazellen; überdies scheint hier das Antigen auf den feinen Zellfortsätzen (microspikes) angereichert vorzukommen (Abb. 2 g,h).

Die Lokalisation in der Immunfluoreszenz gibt natürlich keinen Aufschluß über die biochemische Zusammensetzung des NORM-2 Antigens. Im weiteren wurde das NORM-2 Antigen

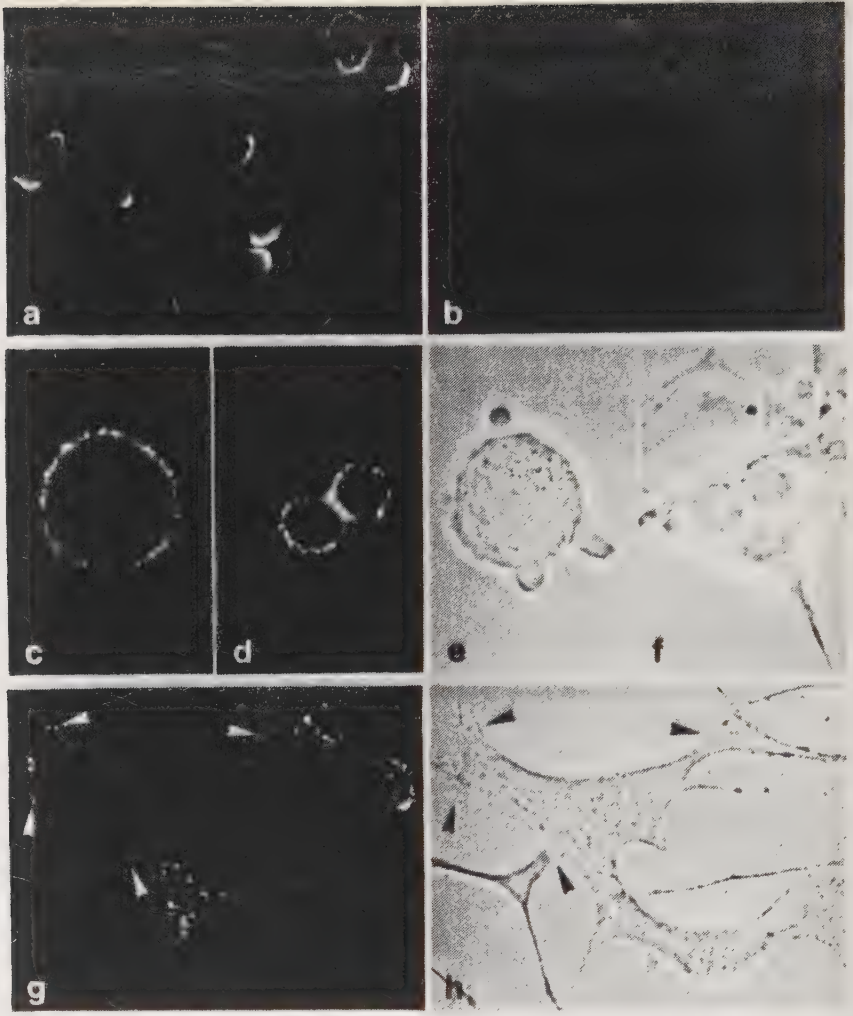
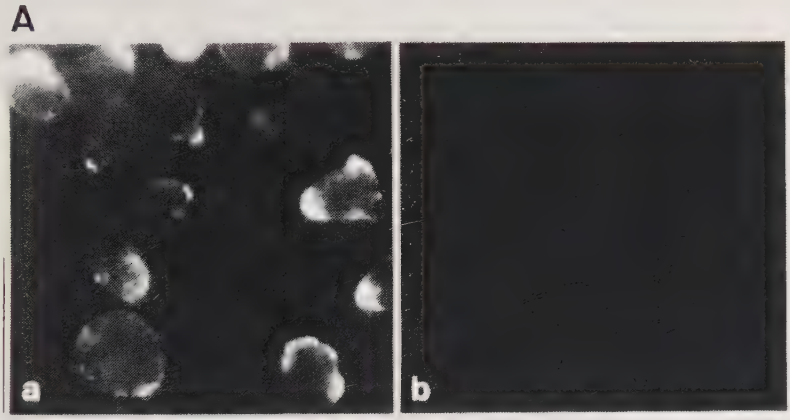


Abb. 2: Immunlokalisation des NORM-2 Antigens auf der Oberfläche von B16 Melanomazellen

Immunfluoreszenz auf trypsinierten B16 Melanomazellen unter "capping" Bedingungen; Färbung mit (a) NORM-2 Antikörper und (b) mit Kontroll-IgG2a.
Immunfluoreszenz mit dem NORM-2 Antikörper auf lebenden B16 Melanomazellen (c) 30 Minuten nach deren Adhäsion, (d) auf Zellen während der Teilung und (g) auf gespreiteten Zellen. Die entsprechenden Phasenkontrastbilder sind in (e,f,h) dargestellt.

nun durch die indirekte Immunfluoreszenz als eine trypsinresistente Komponente auf der Zelloberfläche identifiziert (Abb. 3 A,a). Im Gegensatz dazu bindet der NORM-2 Antikörper jedoch nicht an papainbehandelte Zellen (Abb. 3 A,b). Diese unterschiedliche Sensitivität



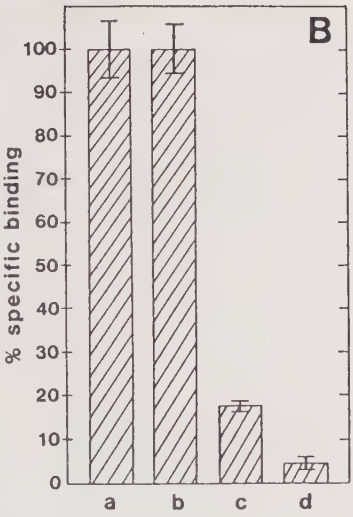


Abb. 3: Bindung des NORM-2 Antikörpers an die Zelloberfläche von protease-behandelten B16 Melanomazellen

A) Immunfluoreszenz auf B16 Melanomazellen, die für 20 Minuten bei 37°C mit (a) 0,01 mg pro ml Trypsin oder (b) 0,01 mg pro ml Papain behandelt wurden.

B) Indirekter Radioimmunassay mit B16 Melanomazellen nach deren Behandlung mit (a) 2 mM EDTA, (b) 0,01 mg pro ml Trypsin für 30 Minuten bei 37°C, (c) 0,01 mg pro ml Papain für 15 Minuten bei 37°C und (d) 0,01 mg pro ml Papain für 30 Minuten bei 37°C.

gegenüber Proteasen konnte auch quantitativ in einem indirekten Radioimmunassay mit NORM-2 Antikörper und ^{125}I-markiertem zweiten Immunglobulin festgestellt werden. Die Vorbehandlung der Bl6 Zellen mit Papain reduzierte die Bindung des NORM-2 Antikörpers bis zu 95 %, während Trypsinierung der Zellen die Antiköperbindung nicht beeinträchtigte (Abb. 3 B). Diese Ergebnisse mit Hilfe der Immunfluoreszenz und des Radioimmunassays zeigen, daß das NORM-2 Antigen ein Protein auf der Oberfläche von Bl6 Melanomazellen darstellt.

Biochemische Identifizierung des NORM-2 Antigens als ein Zelloberflächen-Glykoprotein

Zur weiteren Untersuchung des NORM-2 Antigens wurden biochemische Methoden, hauptsächlich Immunpräzipitationen, eingesetzt. Aus Bl6 Melanomazellen, die mit ^{35}S-Cystein oder mit ^{3}H-Glucosamin metabolisch markiert wurden, konnte durch Immunpräzipitation ein Protein mit einem Molekulargewicht von 83 kd identifiziert werden (Abb. 4 d,f). Die Inkorporation von ^{3}H-Glucosamin in das 83 kd Protein zeigte, daß es sich bei dem NORM-2 Antigen um ein Glykoprotein handelt. Um zu bestätigen, daß das 83 kd Protein auf der Zelloberfläche vorkommt, wurden intakte Bl6 Zellen mit Lactoperoxidase oberflächenjodiert. Die Analyse der Immunpräzipitate bewies, daß das 83 kd Protein unter diesen Bedingungen tatsächlich markiert wurde und demzufolge ein Oberflächenprotein repräsentiert (Abb. 4 h). Nach der metabolischen Markierung mit ^{35}S-Methionin war das immunpräzipitierte 83 kd Protein nur als schwache Bande zu erkennen (Abb. 4

b). Dieses Resultat beruht darauf, daß das NORM-2 Antigen wenige Methioninreste enthält.

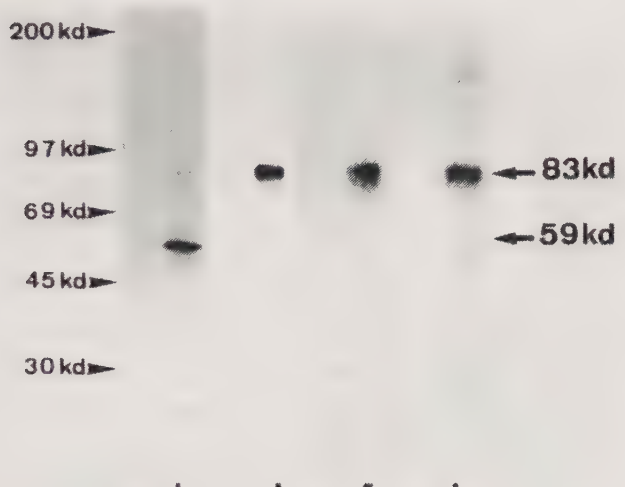


Abb. 4: Immunpräzipitation des NORM-2 Antigens aus radioaktiv markierten B16 Melanomazellen

B16 Melanomazellen wurden mit ^{35}S-Methionin (a,b), ^{35}S-Cystein (c,d) und ^{3}H-Glucosamin (e,f) metabolisch markiert oder mit Jod-125 oberflächenjodiert (g,h). Aus den Triton X-100 Extrakten der Zellen wurde mit NORM-2 Antikörper (b,d,f,h) oder einem Kontroll IgG2a (a,c,e,g) immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden in der SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Die Pfeile auf der linken Seite geben die Position der Molekulargewichtsmarker an.

In Immunpräzipitationen aus ^{35}S-methionin-markierten B16 Melanomazellen wurde neben dem 83 kd NORM-2 Antigen noch ein 59 kd Protein entdeckt (siehe Abb. 4b). Diese 59 kd Komponente ist kein Glykoprotein, ist nicht auf der Zelloberfläche markierbar (Abb. 4 f,h) und erscheint in Immunpräzipitationen aus ^{35}S-cystein-markierten B16 Zellen nur in der zytoplasmatisch löslichen Fraktion (siehe unten). Wahrscheinlich handelt es sich bei der 59 kd Komponente um ein

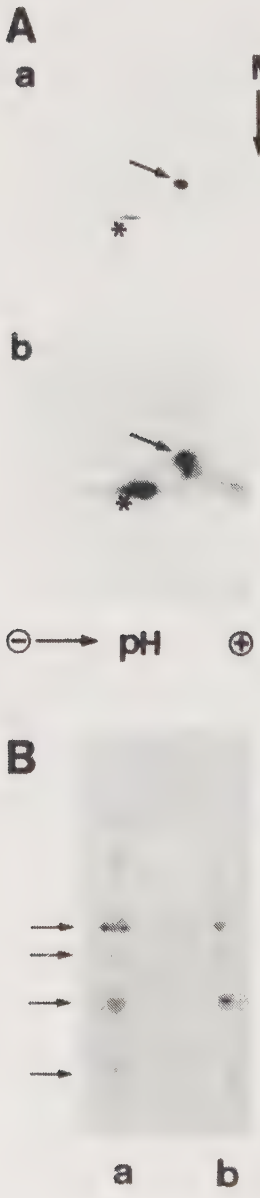


Abb. 5: Charakterisierung des 59 kd Proteins: Vergleich mit Vimentin

A) Auftrennung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese: (a) 59 kd Protein und (b) Vimentin. Das 59 kd Protein (siehe Pfeil) stammt aus ^{35}S-methionin-markierten Immunpräzipitaten mit NORM-2 Antikörper. Vimentin (siehe Pfeil) wurde aus ^{35}S-methionin-markierten B16 Zellen isoliert (siehe Material und Methoden). Die kleinere Komponente (*) repräsentiert Aktin und wurde als Referenz verwendet.

B) "Cleveland Verdau" des 59 kd Proteins (a) und von Vimentin (b). ^{35}S-methionin-markiertes 59 kd Protein und Vimentin wurden nach der Methode von Cleveland mit S. aureus V8 Protease fragmentiert und in 10-20 % SDS-Polyacrylamid Gradientengelen aufgetrennt (siehe Material und Methoden). Die Fragmente mit gleichem Molekulargewicht sind mit Pfeilen markiert.

kontaminierendes Protein des Zytoplasmas. In der Tat konnte anhand der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach O'Farrell und anhand des Peptidmusters des "Cleveland Verdaus" (Cleveland et al., 1977) eine große Ähnlichkeit zu Vimentin, das zu den intermediären Filamentproteinen zählt, festgestellt werden (Abb. 5).

Zur Identifizierung des Proteingerüsts des 83 kd Glykoproteins wurden B16 Melanomazellen mit Tunicamycin behandelt. Dieses Zellgift greift in die Glykoprotein-

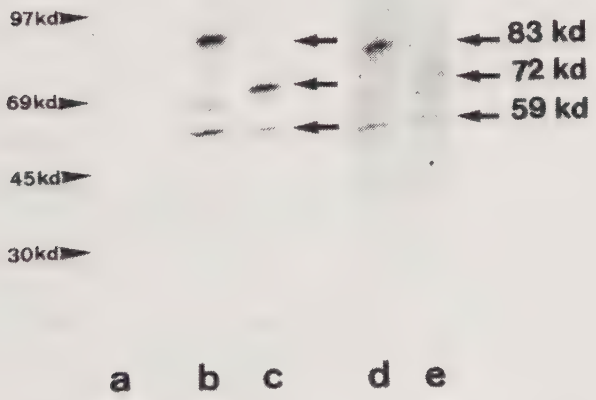


Abb. 6: Identifizierung des 72 kd "Core" Proteins des NORM-2 Antigens

B16 Melanomazellen wurden in Anwesenheit (a,c) und in Abwesenheit (b) von Tunicamycin mit ^{3}H-Leucin radioaktiv markiert. Aus den Triton X-100 Extrakten wurde mit NORM-2 Antikörper (b,c) oder einem Kontroll IgG 2a (a) immunpräzipitiert.

^{3}H-leucinmarkierte Immunpräzipitate wurden mit Endoglykosidase F (e) oder mit Kontrollpuffer (d) behandelt. Die Proben wurden in der SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Das neugebildete "Core" Protein mit einem Molekulargewicht von 72 kd ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

biosynthese ein, in dem es die kovalente Bindung der Kohlenhydratketten an Asparaginreste des "Proteincores" verhindert. Für Bl6 Zellen waren 3 ug pro ml Tunicamycin optimal, da diese Konzentration den Einbau von ^{3}H-Glucosamin auf ein Zehntel reduzierte, gleichzeitig aber eine geringe toxische Wirkung zeigte (siehe auch Material und Methoden). Aus diesen mit ^{3}H-Leucin markierten Bl6 Zellen wurde ein 72 kd "Proteincore" des NORM-2 Antigens immunpräzipitiert (Abb. 6c). Dieser 72kd "Core" konnte auch durch den Verdau von Immunpräzipitaten mit Endoglykosidase F gewonnen werden (Abb. 6e). Das 83 kd Protein scheint somit aus einem Kohlenhydratanteil von 10 - 15 kd zu bestehen, die antigene Determinante ist jedoch offensichtlich auf dem Proteingerüst lokalisiert.

In der zweidimensionalen Gelelektophorese wurde das 83kd Protein in einem pH-Bereich von 4,3 und 5,1 elektrofokussiert. Der Hauptfleck hatte einen isoelektrischen Punkt von 4,7 (siehe Pfeil in Abb. 7). Die starke Heterogenität in der isoelektrischen Fokussierung beruht wahrscheinlich auf dem hohen Kohlenhydratanteil und auf Unterschieden im Glykosylierungsmuster des 83 kd Proteins.

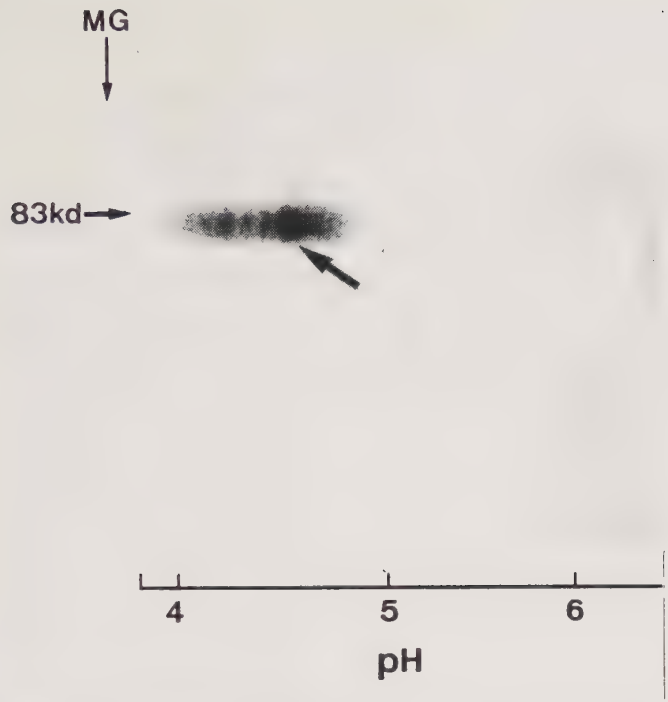


Abb. 7: Auftrennung des 83 kd Glykoproteins in der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Das 83 kd NORM-2 Antigen wurde aus ^{3}H-glucosamin-markierten Bl6´ Melanomazellen mit NORM-2 Antikörper immunpräzipitiert und in der zweidimensionalen Gel-elektrophorese nach der Methode von O'Farrell analysiert. Der Hauptfleck des 83 kd Glykoproteins ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. (MG = Molekulargewicht)

Biochemische Identifizierung des NORM-2 Antigens als ein integrales Membranprotein.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, auf welche Weise das NORM-2 Antigen auf der Zelloberfläche verankert ist. Im allgemeinen sind periphere Membranproteine und extrazelluläre Matrixkomponenten durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der Zelle verbunden und werden bei hoher Ionenstärke oder durch

Chelatkomplexbildner (z.B. EDTA) dissoziiert. Integrale Membranproteine sind aufgrund ihrer amphipathischen Struktur in die Lipiddoppelschicht eingebettet und können durch Detergenzien in Lösung gebracht werden (Singer, 1974). Die Immunpräzipitation aus Extrakten radioaktiv markierter B16 Melanomazellen zeigte nun, daß Detergenzien wie Deoxycholat und Triton X-100 das 83 kd Protein herauslösten (Abb. 8 e,f), während hohe Ionenstärke oder EDTA unwirksam waren (Abb. 8 a-d). Vielmehr

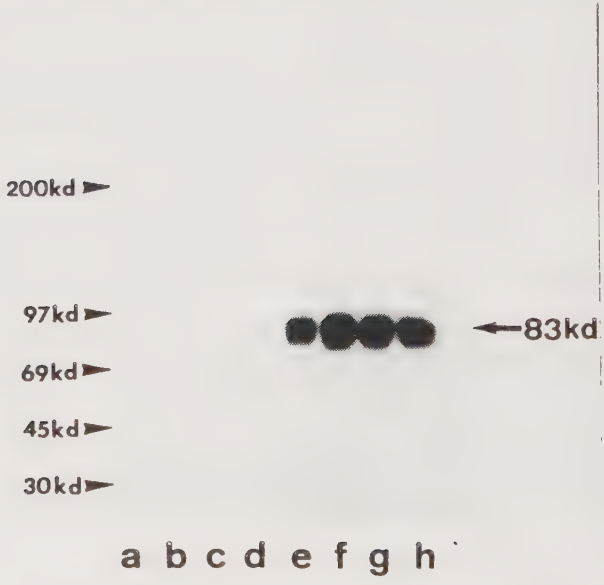


Abb. 8: Extraktion des NORM-2 Antigens unter verschiedenen Bedingungen

^{3}H-glucosaminmarkierte B16 Melamonazellen wurden mit (a) 10 mM HEPES, (b) PBS, (c) 1,7 M NaCl, (d) 10 mM EDTA, (e) 0,5 % Deoxycholat und (f) 1 % Triton X-100 extrahiert. In (g) und (h) wurde das unlösliche Pellet von (a) und (d) nach der Ultrazentrifugation bei 100'000 g in 1 % Triton X-100, 0,5 % Deoxycholat reextrahiert. Die Extrakte wurden für die Immunpräzipitation mit NORM-2 Antikörper eingesetzt.

pelletierte das NORM-2 Antigen in Abwesenheit von Detergenzien mit dem unlöslichen Material und konnte erst durch die Reextraktion mit Triton X-100 und Deoxycholat dissoziiert werden (Abb. 8 g,h). Aufgrund dieser Ergebnisse kann man annehmen, daß das NORM-2 Antigen als integrales Membranprotein auf der Oberfläche der B16 Melanomazellen vorliegt. Zur quantitativen Analyse der Extrahierbarkeit wurde das Antigen im indirekten Radioimmunassay mit NORM-2 Antikörper und ^{125}I-markiertem Anti-Maus Immunoglobulin radioaktiv markiert und mit Triton X-100 extrahiert. Als positive Kontrolle diente die Extrahierbarkeit eines Histokompatibilitäts-Antigens ($H\text{-}2D^bK^b$). Es zeigte sich, daß 60 - 70 % der NORM-2 Radioaktivität in Lösung ging, d.h. die Hauptmenge des NORM-2 Antigens scheint nicht oder nur schwach mit dem Zytoskelett verbunden zu sein (Tabelle 1).

Tabelle 1. Extrahierbarkeit des NORM-2 Antigens von der Zelloberfläche mit Detergenz.

	Triton X-100 extrahierbare cpm (% von total)	
Antigen	12.000g Überstand	100.000g Überstand
NORM-2	70	61
$H\text{-}2D^bK^b$	98	85

B16 Melanomazellen wurden mit NORM-2 Antikörper oder anti-H-2 Antikörper und ^{125}I-markiertem Ziege anti-Maus Immunglobulin auf der Oberfläche markiert. Die gewaschenen Zellen wurden anschließend mit Triton X-100 lysiert und die extrahierbare Radioaktivität im Überstand bestimmt.

Die Bindungsstudien mit NORM-2 Antikörper an lebenden Bl6 Melanomazellen haben gezeigt, daß das NORM-2 Antigen gegenüber Papain empfindlich ist (siehe oben). Diese Eigenschaft wurde beim Versuch berücksichtigt, ein extrazelluläres Fragment des NORM-2 Antigens zu isolieren. Tatsächlich wurde durch die Papainbehandlung intakter Zellen ein lösliches 60 kd Fragment freigesetzt (Abb. 9 c), das wahrscheinlich die gesamte extrazelluläre Domäne des 83 kd Membranproteins repräsentiert. Auf jeden Fall besitzt es die unversehrte Bindungsstelle für den NORM-2 Antikörper. Da keine kleineren Fragmente immunpräzipitiert werden konnten, muß man annehmen, daß bei Weiterverdau des 60 kd Fragments die antigene Determinante zerstört wird.

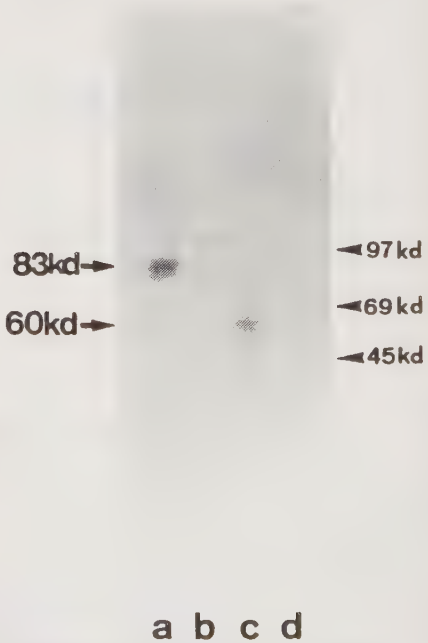


Abb. 9: Isolierung eines Papainfragments des NORM-2 Antigens

Mit ^{3}H-Glucosamin markierte Bl6 Melanomazellen wurden mit 0,1 mg pro ml Papain für 30 Minuten bei 37°C inkubiert (siehe Material und Methoden). Aus dem Überstand (c) und dem Lysat der papainbehandelten Zellen (d) wurde mit NORM-2 Antikörper immunpräzipitiert. Unbehandelte Kontrollzellen wurden für die Immunpräzipitation mit NORM-2 Antikörper (a) und einem Kontroll IgG2a (b) verwendet. Das 60 kd Papainfragment ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Subzelluläre Verteilung des NORM-2 Antigens

Die subzelluläre Verteilung des NORM-2 Antigens wurde an ^{3}H-glucosamin- und ^{35}S-cystein- markierten Bl6 Melanomazellen untersucht. Durch differentielle Zentrifugation wurden die Zellorganellen in Kerne (800 g), in 100'000 g Pellets und in 100'000 g Überstände aufgetrennt. Dabei befand sich der Hauptanteil der Glykoproteine im 100'000g Pellet (Abb. 10A, c), während der Hauptanteil der Gesamtproteine im 100'000 g Überstand gemessen wurde (Abb. 10A, b'). Wie die meisten Glykoproteine war das NORM-2 Antigen vor allem im 100'000 g Pellet angereichert (Abb. 10B, c, c'). In ^{35}S-cystein-markierten Immunpräzipitaten aus dem 100'000 g Überstand wurde neben dem 83 kd NORM-2 Antigen auch die 59 kd Kontaminante beobachtet (Abb. 10 B, b'). Aus diesem Ergebnis kann man somit schließen, daß das 83 kd NORM-2 Antigen und das 59 kd Protein mengenmäßig in verschiedenen Fraktionen der Zelle vorkommen, d.h. das 83 kd NORM-2 Antigen ist eher mit der membran-enthaltenden Fraktion (= 100'000 g Pellet) assoziiert, während das 59 kd Protein im 100'000 g Überstand angereichert vorkommt.

Abhängigkeit der Antikörperbindung von der Konformation des Antigens

In den vorhergehenden Abschnitten wurde das NORM-2 Antigen unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-Gelelektrophorese analysiert. In den folgenden Experimenten wurde nun gezeigt, daß das NORM-2 Antigen unter nichtreduzierenden Bedingungen (in Abwesenheit von Mercapto-

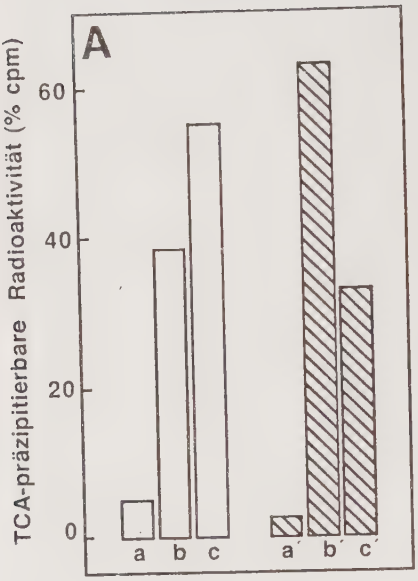
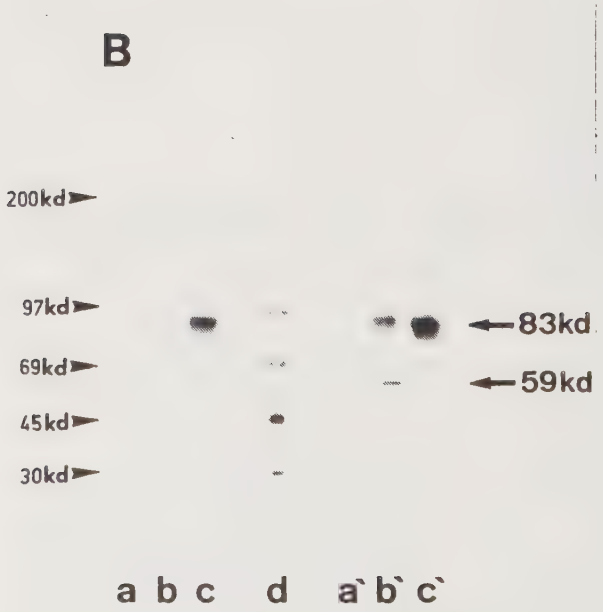


Abb. 10: Subzelluläre Lokalisation des NORM-2 Glykoproteins

A) Verteilung der radioaktiv markierten Proteine in den verschiedenen Zellfraktionen: Kerne (a), 100'000 g Überstand (b) und 100'000 g Pellet (c). B16 Melanomazellen wurden mit ^{3}H-Glucosamin (a - c) oder ^{35}S-Cystein (a' - c') radioaktiv markiert.

B) Immunpräzipitation mit dem NORM-2 Antikörper aus den einzelnen subzellulären Fraktionen wie unter A). Die Immunpräzipitate wurden in der SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Molekulargewichtsmarker sind in (d) angegeben.



ethanol) ein Molekulargewicht von 105 kd hat (Abb. 11 A, a,d). Dieses 105 kd Protein konnte durch Reduktion vollständig in die 83 kd Form umgewandelt werden (Abb. 11 A, b,e), was beweist, daß die beiden Proteine identisch sind. Bei der Extraktion des 105 kd Proteins mußte jeweils das Sulfhydrylreagenz N-Ethylmaleinimid (NEM) zum Lysispuffer dazugegeben werden (siehe dazu Material und Methoden), denn ohne NEM ergab sich ein uneinheitliches Muster von Proteinbanden mit Molekulargewichten von 80 - 220 kd (Abb. 11 B,a). Alle diese Formen gingen unter reduzierenden Gelbedingungen ebenfalls in die 83kd Form über (Abb. 11 B,b), und vermutlich sind artifiziell gebildete inter- und intramolekulare Disulfidbrücken die Ursache für die Heterogenität. Interessanterweise bindet der NORM-2 Antikörper nur an die nichtreduzierte, 105 kd Form des NORM-2 Antigens. Dies wurde aus Experimenten geschlossen, in denen die Zelllysate vor der Immunpräzipitation mit Dithiothreitol (DTT) behandelt wurden. Unter diesen Bedingungen konnten nur geringe Mengen NORM-2 Antigen präzipitiert werden (Abb. 11 C). Andereseits konnte die Ausbeute an NORM-2 Antigen deutlich erhöht werden, wenn die Bl6 Zellen in Anwesenheit von NEM extrahiert wurden. Anscheinend werden bei der Lysis in Abwesenheit von NEM intrazelluläre Sulfhydrylkomponenten (z.B. Gluthathion) freigesetzt, die zur partiellen Reduktion des NORM-2 Antigens und schließlich zur verringerten Ausbeute in der Immunpräzipitation führen. Zusammenfassend kann man aus diesen Ergebnissen schließen, daß die native Faltung des NORM-2 Antigens und die korrekte Ausbildung

von Disulfidbrücken eine wichtige Rolle bei der Erkennung durch den Antikörper spielt.

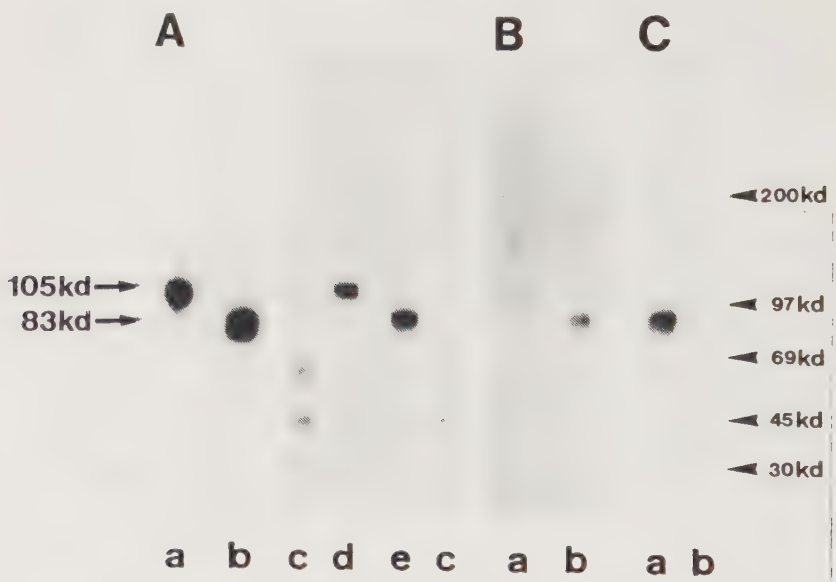


Abb. 11: Analyse des NORM-2 Glykoproteins unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen

A) Bl6 Melanomazellen wurden mit Jod-125 oberflächenjodiert (a, b) oder mit ^{3}H-Glucosamin metabolsich markiert (d, e) und in Anwesenheit von 3 mM N-Ethylmaleinimid (NEM) extrahiert. NORM-2 Immunpräzipitate wurden unter (a, d)) nichtreduzierenden oder (b, e) reduzierenden Bedingungen analysiert. In (c) sind die Molekulargewichtsmarker gezeigt.

B) Bl6 Melanomazellen wurden oberflächenjodiert und ohne NEM extrahiert. NORM-2 Immunpräzipitate wurden unter (a) nicht reduzierenden und (b) reduzierenden Bedingungen analysiert.

C) Immunpräzipitation mit NORM-2 Antikörper aus (b) reduzierten oder (a) nichtreduzierten ^{125}I-markiertem Extrakt.

Isolierung des 83 kd Proteins

Zur Herstellung weiterer monoklonaler Antikörper und eines polyklonalen Antiserums, sowie zur Sequenzierung des N-terminalen Bereichs wurde das 83 kd NORM-2 Antigen aus B16 Melanomazellen gereinigt. Um B16 Zellen im großen Maßstab zu züchten, wurden Suspensionskulturen angelegt.

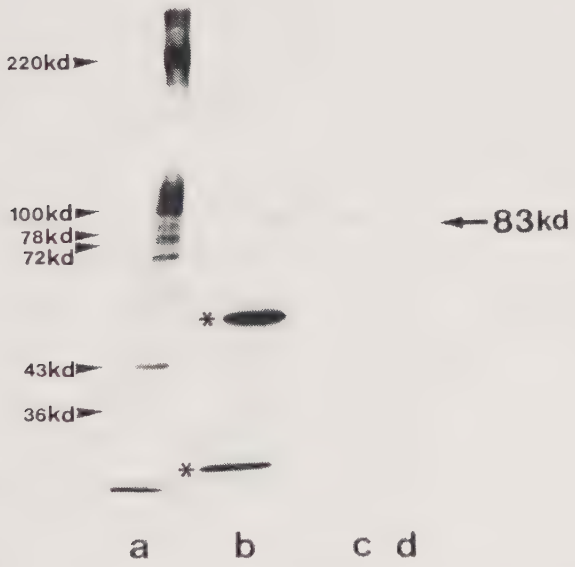
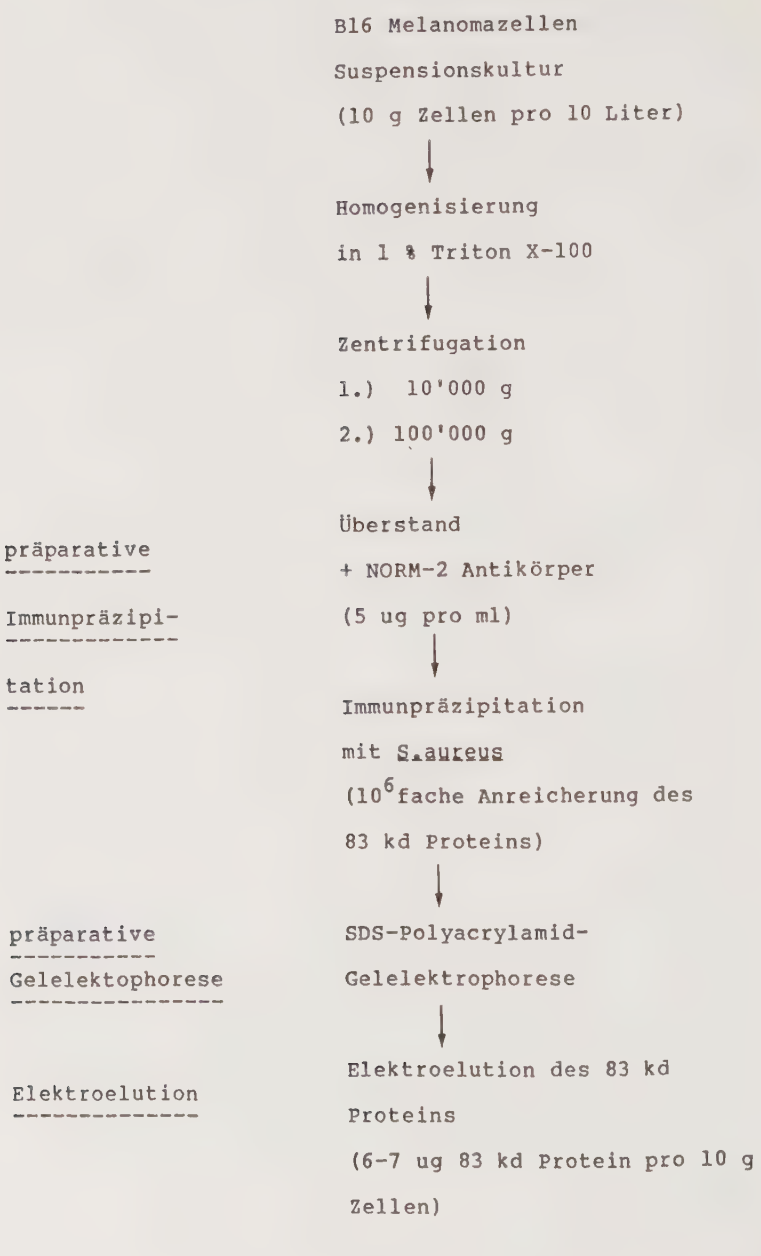


Abb. 13: Reinigung des 83 kd Proteins aus B16 Melanomazellen

Das 83 kd Protein wurde nach dem Schema der Abb. 13 isoliert und in der SDS-Gelelektrophorese und mit Silberfärbung analysiert. Gezeigt ist die Analyse von (b) 1/150 der präparativen Immunpräzipitation, (c,d) 1/100 und 1/200 des Elektroeluats. In (a) sind Erythrozytenmembranen als Molekulargewichtsmarker gezeigt. Das 83 kd Protein ist mit einem Pfeil, die schwere und leichte Kette des NORM-2 Antikörpers mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Abb. 12: Schema der Isolierung des 83 kd Proteins aus B16 Melanomazellen



Auf diese Weise konnten aus 10 Liter Medium etwa 10 g gepackte Zellen gewonnen werden. Die Immunfluoreszenz zeigte, daß auch diese Zellen die gewohnte Menge des NORM-2 Antigens exprimierten. Zur Reinigung des 83 kd Proteins wurde eine präparative Immunpräzipitation und eine präparative SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Elektroelution eingesetzt (Abb. 12). Die Analyse der präparativen Immunpräzipitation durch die SDS-Gelelektrophorese zeigte, daß im allgemeinen aus 10 g Zellen 10 ug 83 kd Protein gewonnen werden konnten, was einer 10^6-fachen Anreicherung entspricht (Abb. 13 b). Diese Präparation war erwartungsgemäß noch mit Antikörper verunreinigt und wurde deshalb in einer präparativen SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das 83 kd NORM-2 Antigen wurde anschließend aus der entsprechenden Gelregion elektroeluiert und hatte sich danach als rein erwiesen (Abb. 13 c,d); die Ausbeute an eluiertem Protein betrug zwischen 60 und 70 %. Aus 10 g Bl6 Zellen konnten also letztlich 6 - 7 ug gereinigtes 83 kd Protein gewonnen werden.

Abhängigkeit der NORM-2 Antigenexpression vom Wachstumszustand der B16 Melanomazellen

Das NORM-2 Antigen wurde aufgrund der biochemischen Untersuchung als ein 105/83 kd Glykoprotein charakterisiert, das als integrales Membranprotein auf der Oberfläche von B16 Melanomazellen vorkommt. Die hemmende Wirkung des NORM-2 Antikörpers auf die Proliferation von B16 Melanomazellen (siehe Vollmers et al. 1985) wird also wahrscheinlich durch die Bindung des Antikörpers an dieses Molekül vermittelt. Das 105/83 kd Protein scheint infolgedessen eine funktionelle Bedeutung bei der Wachstumskontrolle der B16 Melanomazellen zu haben. Tatsächlich konnte aus den folgenden Experimenten eine starke Korrelation zwischen der Expression des NORM-2 Antigens und dem Wachstumsstatus der Zellen abgeleitet werden.

B16 Melanomazellen, die durch Serumentzug oder durch eine hohe Zelldichte in der Kulturschale in ihrem Wachstum gehemmt waren, wurden mit proliferierenden, subkonfluenten B16 Zellen im indirekten Radioimmunassay verglichen. Dabei zeigte sich, daß die proliferierenden B16 Zellen bis zu zehnmal mehr NORM-2 Antigen auf der Oberfläche exprimierten als gehemmte Zellen (Abb. 14 A). Die Syntheserate des 105/83 kd Proteins, die in der Immunpräzipitation gemessen wurde, war in den wachsenden Zellen ebenfalls deutlich erhöht (Abb. 14 B). Die Unterschiede der NORM-2 Antigenmenge auf der Zelloberfläche beruhen also anscheinend auf Unterschieden in der wachstumsabhängigen Synthese des NORM-2 Antigens. Im

weiteren wurde die Reexpression des 105/83 kd Proteins auf der Zelloberfläche in Abhängigkeit vom zeitlichen Ablauf der DNS-Synthese untersucht. Gehemmte B16 Zellen wurden mit Serum stimuliert und die NORM-2 Antigenmenge in den darauffolgenden 24 Stunden im indirekten Radio-

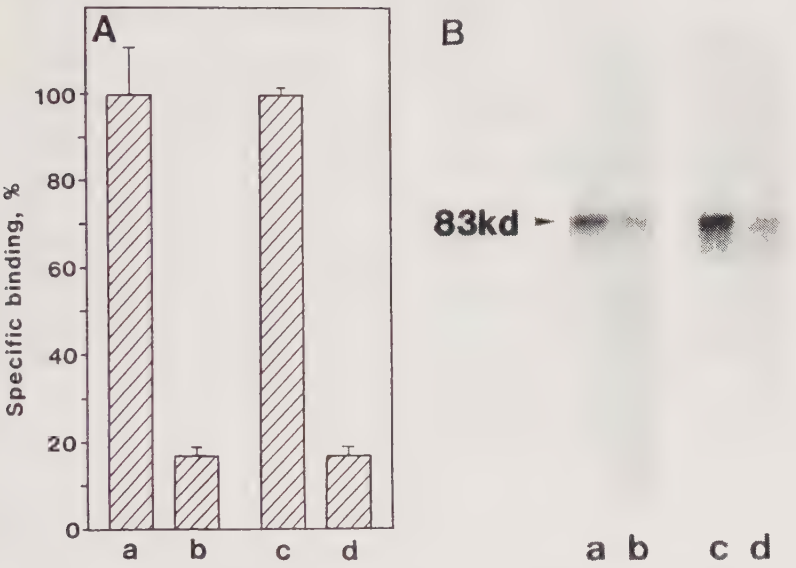


Abb. 14: Abhängigkeit der NORM-2-Antigenexpression von der Serumkonzentration und der Zelldichte

A) Expression des NORM-2 Glykoproteins auf der Oberfläche von B16 Melanomazellen, die 24 Stunden in (a) 10% oder (b) 0,1 % fötalem Kälberserum gezüchtet wurden. Expression in (c) subkonfluenten oder in (d) "denstiy arrested" B16 Zellen. Die NORM-2 Antigenmenge wurde bei gleicher Zellzahl im indirekten Radioimmunassay bestimmt. In (a) wurden 2,5 x 10^4 cpm pro 1 x 10^6 Zellen und in (c) 1,5 x 10^4 cpm pro 1 x 10^6 Zellen gemessen (= 100 %).

B) Neusynthese des NORM-2-Glykoproteins in B16 Melanomazellen nach 24-stündiger Inkubation mit (a) 10 % oder (b) 0,1 % fötalem Kälberserum. Neusynthese in (c) subkonfluenten oder (d) "density-arrested" Zellen. Für die Immunpräzipitation des NORM-2 Antigens wurden ^{3}H-glucosaminmarkierte Zellysate mit identischer, TCA-präzipitierbarer Radioaktivität verwendet.

immunassay gemessen. Es zeigte sich, daß die Menge an 105/83 kd Protein beim Übergang von der GO/G1- in die S-Phase exponentiell anstieg (Abb. 15 A). Somit zählt das NORM-2 Antigen zu den spät exprimierten proliferations-assoziierten Komponenten. Um festzustellen, ob das 105/83 kd Protein auch funktionell in der GO/G1-S-Phase von Bedeutung ist, wurde der Einbau von ^{3}H-Thymidin in der Anwesenheit von NORM-2 Antikörper oder einem Kontroll-IgG2a gemessen. B16 Zellen, die mit NORM-2 Antikörper inkubiert waren, zeigten während der ersten 24 Stunden eine Reduktion im ^{3}H-Thymidineinbau um 70 % (Abb. 15 B). Anscheinend spielt das NORM-2 Antigen vor oder während der DNS-Synthesephase eine regulatorische Rolle in proliferationskompetenten B16 Melanomazellen.

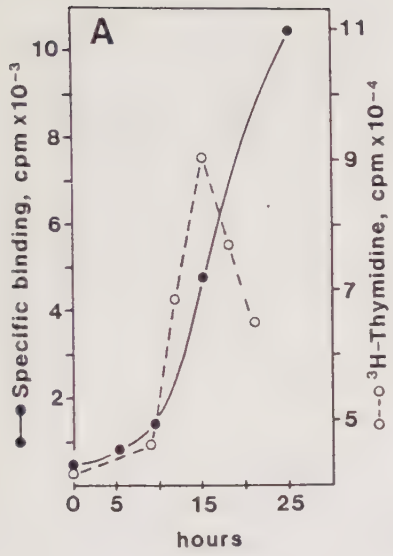
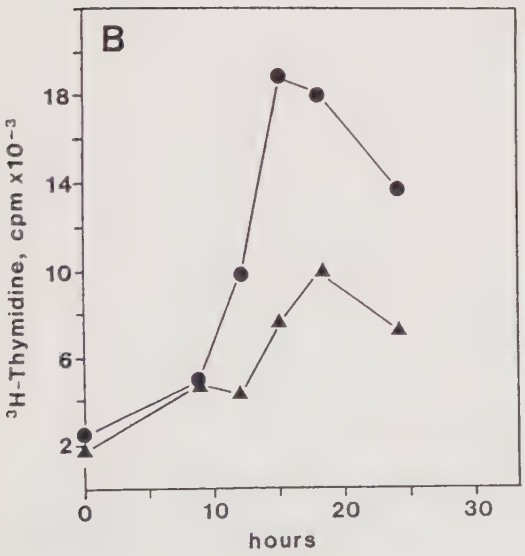


Abb. 15: Reexpression des NORM-2 Antigens in serum-stimulierten B16 Melanomazellen. Hemmung der Proliferation mit NORM-2 Antikörper

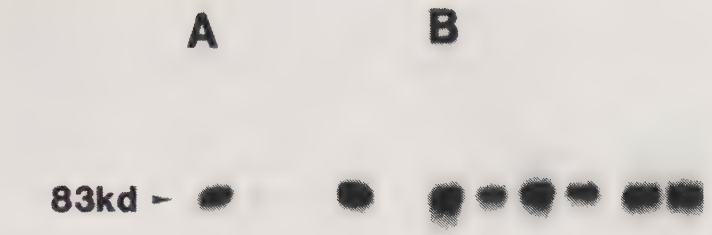
A) Reexpression des NORM-2 Antigens auf der Oberfläche von B16 Melanomazellen (●——●) in zeitlicher Abhängigkeit zum ^{3}H-Thymidineinbau (o---o). Die NORM-2 Antigenmenge wurde im indirekten Radioimmunassay bestimmt.

B) B16 Melanomazellen wurden in Anwesenheit von 10 ug pro ml NORM-2 Antikörper (▲——▲) oder Kontroll IgG2a (●——●) mit 2 % Kälberserum restimuliert. Der Thymidineinbau wurde wie in Material und Methoden beschrieben bestimmt.



Modulierung der NORM-2 Antigenexpression durch "transforming growth factor-ß" (TGF-ß)

In den vorher beschriebenen Experimenten erwies sich die Regulierung des NORM-2 Antigens als abhängig vom Wachstumszustand der Bl6 Melanomazellen. Im weiteren wurde nun untersucht, ob spezifisch wachtumsregulierende Faktoren eine gezielte Änderung in der Expression des NORM-2 Antigens hervorrufen. Von "transformig growth factor-ß" war bekannt, daß dieser Faktor das Wachstum verschiedener Tumorzellen inhibiert, auch z.B. von Bl6 Melanomazellen (Tucker et al., 1985, Roberts et al., 1985, Wieland et al., 1986). Bl6 Zellen, die für 2 Tage mit TGF-ß behandelt wurden, zeigten eine erheblich verringerte Biosynthese des 105/83 kd Proteins, und die Kombination von TGF-ß mit NORM-2 Antikörper führte sogar zu einer Verstärkung dieses Effekts (Abb. 16 A,b,c). Die quantitative Analyse der 83 kd Gelbanden ergab eine Reduktion der Neusynthese von 75 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dagegen wirkte der NORM-2 Antikörper alleine eher stimulierend (Abb. 16 A,d). Mit wachstumsstimulierenden Faktoren wie "platelet-derived growth factor" (PDGF), "epidermal growth factor" (EGF), oder deren Kombination, sowie mit "nerve growth factor" (NGF) wurde keine signifikante Änderung in der Syntheserate beobachtet (Abb. 16 B). Bei TGF-ß behandelten Bl6 Zellen war auch die Menge an oberflächenexprimiertem NORM-2 Antigen reduziert, und die Mischung von TGF-ß und NORM-2 Antikörper wirkte wiederum synergistisch (Abb. 16 C). Um auszuschließen, daß die beobachtete Reduktion der NORM-2 Antigenmenge auf der direkten Konkurrenz zwischen



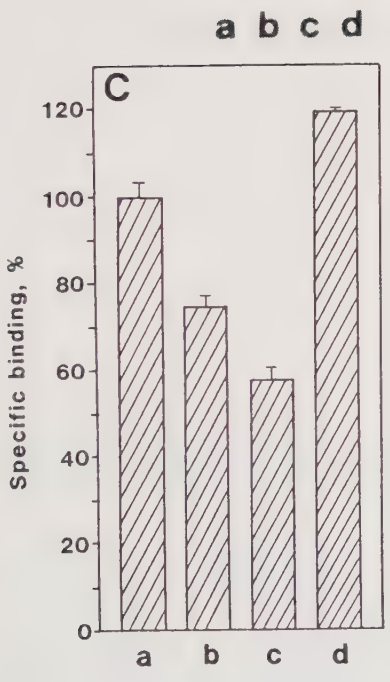


Abb. 16: Inhibition der NORM-2 Antigenexpression durch "transforming growth factor-beta" (TGF-ß)

A) Immunpräzipitation von neusynthetisiertem NORM-2 Glykoprotein aus (a) unbehandelten B16 Zellen oder aus B16 Zellen nach zweitägiger Behandlung mit (b) 3 ng pro ml TGF-ß, (c) TGF-ß plus 5 ug pro ml NORM-2 Antikörper und (d) NORM-2 Antikörper. Das NORM-2 Antigen wurde aus ^{3}H-glukosamin-markierten Zellysaten mit identischer TCA-präzipitierbarer Radioaktivität immunpräzipitiert.

B) Immunpräzipitation des NORM-2 Glykoproteins aus B16 Melanomazellen nach zweitägiger Behandlung mit (b) 1 ng pro ml PDGF, (c) 5 ng pro ml EGF, (d) PDGF plus EGF und (f) 10 ng pro ml NGF. (a) und (e) Repräsentieren die Immunpräzipitationen aus unbehandelten Zellen (a ist die Kontrolle für b - d, e ist die Kontrolle für f).

Forts. Abb. 16:

C) Expression des NORM-2 Antigens auf der Oberfläche von (a) unbehandelten B16 Melanomazellen, von B16 Zellen nach der Behandlung mit (b) TGF-ß, (c) TGF-ß plus NORM-2 Antikörper und (d) NORM-2 Antikörper. Die Konzentrationen für TGF-ß und NORM-2 Antikörper und die Dauer der Behandlung sind die gleichen wie in A). Die NORM-2 Antigenmenge auf der Zelloberfläche wurde bei gleicher Zellzahl im indirekten Radioimmunassay bestimmt. Die spezifische Bindung von $1{,}5 \times 10^4$ cpm pro 1×10^4 Zellen wurde in (a) als 100% angenommen.

NORM-2 Antikörper- und TGF-ß-Bindung beruht, wurde das NORM-2 Antigen nach der Vorinkubation mit TGF-ß immunpräzipitiert. Dabei konnte kein Unterschied in der 105/83 kd Proteinmenge festgestellt werden (Abb. 17). Insgesamt weisen diese Experimente daraufhin, daß wachstumsinhibitorische Mechanismen einen erheblichen Einfluß auf die Regulierung des NORM-2 Antigens ausüben.

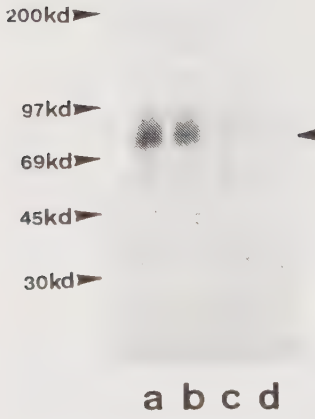


Abb. 17: Immunpräzipitation des NORM-2 Antigens in Anwesenheit von TGF-ß

Immunpräzipitation aus ^{3}H-glucosaminmarkiertem B16 Zell-Lysat, das mit (a,b) 2 ug pro ml und (c,d) 0,5 ug pro ml NORM-2 Antikörper in Anwesenheit von 20 ng pro ml TGF-ß (b,d) oder ohne TGF-ß (a,c) inkubiert worden war.

Es stellte sich nun die Frage nach der detaillierten Wirkungsweise des NORM-2 Antikörpers in der Wachstumshemmung der Melanomazellen. In vielen Fällen werden Oberflächenproteine mit Antikörper quervernetzt, was anschließend zur Internalisierung der Antigen-Antikörperkomplexe führt (Old et al., 1968, Schreiber et al. 1981, Beguinot et al., 1984, Debrin et al. 1985). Im Gegensatz dazu wurde das NORM-2 Antigen aber nicht von der Zelloberfläche herunterreguliert (Abb. 18). Vielmehr scheint die unmittelbare Bindung des NORM-2 Antikörpers an das 105/83 kd Protein zu genügen, ein wachtumsinhibierendes Signal zu vermitteln.

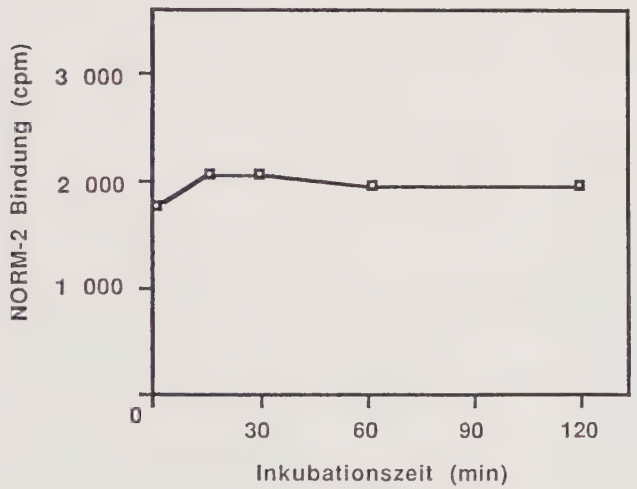


Abb. 18: Ausbleiben der Antigenmodulation in Anwesenheit des NORM-2 Antikörpers

Trypsinisierte B16 Melanomazellen wurden mit 10 ug pro ml NORM-2 Antikörper bei 37°C in Suspension inkubiert. Die NORM-2 Antigenmenge wurde zu verschiedenen Zeitpunkten im indirekten Radioimmunassay mit NORM-2 Antikörper und ^{125}I-Ziege-anti-Maus-Immunglobulin bei 4°C gemessen.

Vorkommen des NORM-2 Antigens auf verschiedenen Zellinien: Koexpression mit Rezeptoren für TGF-ß und NGF

Die Expression des NORM-2 Antigens auf anderen tierischen und humanen Zellen wurde im indirekten Radioimmunassay bestimmt. Von den getesteten Zellinien der Maus exprimierte die Neuroblastomalinie Neuro 2a etwa 10 % und Cloudman Melanomazellen etwa 2 % im Vergleich zu B16 Zellen. Dagegen waren 3T3 Fibroblasten der Maus negativ. Aus ^{3}H-glucosamin-markierten Neuro 2a Zellen, jedoch nicht aus Fibroblasten, konnte durch die Immunpräzipitation ebenfalls ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 83 kd entdeckt werden (Abb. 19). Von den humanen Melanomalinien zeigten MALME 3M, A875 und MEC-EM etwa 5 %, SK-N-MC Neuroblastomazellen 2 % und embryonale Fibroblasten (WI38) 3 % der Antikörperbindung von B16 Zellen.

Abb. 19: Immunpräzipitation des NORM-2 Antigens aus Neuro 2a-Zellen

Aus ^{3}H-glucosamin-markierten Neuro 2a-Zellen wurde mit (a) NORM-2 Antikörper oder (b) einem Kontroll IgG2a immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

In funktioneller Hinsicht üben TGF-ß und der NORM-2 Antikörper ähnliche Effekte auf Bl6 Melanomazellen aus, beide führen zur Wachstumsinhibition der Zellen. In "crosslinking" Experimenten identifizierte Massague (1985) zwei TGF-ß Rezeptortypen, ein 280 kd und ein 85kd Oberflächenprotein. Weiterhin konnte aufgrund der

Tabelle 2. Spezifische Bindung des NORM-2 Antikörpers und von NGF und TGF-ß an verschiedene Zellinien.

	Spezifische Bindung (cpm)		
Zellinien	NORM-2[a)]	^{125}I-NGF	^{125}I-TGF-ß[b)]
Bl6Fl	14.812	629	1.034
Neuro 2a	1.031	9.756	777
NIH 3T3	0	n.b.	2.542
A875	594	46.327	1.776
MALME-3M	876	6.682	2.120

Die spezifische Bindung wurde wie in Material und Methoden beschrieben bestimmt. a) Die NORM-2 Antikörperbindung wurde im indirekten Radioimmunassay bestimmt. b) Die TGF-ß Bindungsexperimente wurden von Dr. G. Müller durchgeführt.

biochemischen Eigenschaften des 105/83 kd NORM-2 Antigens eine starke Ähnlichkeit mit dem kürzlich charakterisierten NGF-Rezeptor der A875 Melanomazellen festgestellt werden (Grob et al., 1985). Im folgenden Experiment wurde nun die Expression des NORM-2 Antigens mit der Expression der NGF- und TGF-ß Rezeptoren auf

verschiedenen Zellen verglichen. Dabei zeigte sich, daß das 105/83 kd NORM-2 Antigen, sowie die NGF- und TGF-ß-Rezeptoren quantitativ unterschiedlich auf den Zellinien verteilt sind. Zum Beispiel exprimierten A875 Melanomazellen etwa 25 mal mehr NGF-Rezeptoren, andererseits zeigten sie aber 25 mal weniger NORM-2 Antikörperbindung im Vergleich zu Bl6 Zellen (Tabelle 2). Anscheinend ist das 105/83 kd Protein also mit keinem dieser Rezeptoren identisch.

Wang, 1986). Ein weiterer Wachstumsinhibitor wurde aus Brustdrüsenzellen gereinigt; dieser hemmt auch das Wachstum von Ehrlich-Aszites Karzinomazellen in_vitro (Böhmer et al., 1985). Auch für Melanomazellen wurden Wachstumsinhibitoren beschrieben; zum Beispiel wurde aus Harding-Passay Melanomazellen der Maus eine niedermolekulare "Aktivität" isoliert, welche die DNS- und Proteinsynthese von B16 Melanomazellen der Maus inhibiert (Seij, 1974). Im allgemeinen scheinen Chalone die Zellproliferation in der G1 Phase des Zellzyklus zu stoppen.

Eine andere Gruppe von Wachstumsinhibitoren repräsentieren die Zytokine, die von den Zellen des Immunsystems gebildet werden. Die Zytokine, wie zum Beispiel die Interferone und die Tumor-Nekrosis-Faktoren (TNF), besitzten jedoch keine strikte Gewebs- oder Zellspezifität und können zytotoxisch oder zytostatisch auf neoplastische Zellen einwirken. Die Interferonforschung hat gezeigt, daß bestimmte Krebsarten, wie etwa die Haarzell-Leukämie, durch eine Interferon-Therapie eingedämmt oder sogar geheilt werden können (Friedman und Vogel, 1983; Lee et al., 1984; Old, 1983; Sugarman et al., 1985).

Erst kürzlich wurde eine dritte Familie inhibitorischer Moleküle entdeckt. Der am besten untersuchte Vertreter dieser Gruppe ist der transformierende Wachstumsfaktor-ß (TGF-ß). Der TGF-ß wurde ursprünglich zusammen mit TGF-α, welcher wie EGF wirkt, entdeckt; beide Faktoren in Kombination können normale Fibroblasten zur rever-

"capping" Bedingungen entdeckt werden, wenn die Antigen-Antikörper-Komplexe auf einen Pol der Zelle konzentriert sind. Dieses Experiment zeigte außerdem, daß das NORM-2 Antigen mobil in der Plasmamembran verankert ist.

Das immunpräzipitierbare NORM-2 Antigen war nach metabolischem Einbau von ^{3}H-Glucosamin markiert. Dies beweist, daß das 83kd NORM-2 Antigen ein Glykoprotein repräsentiert. Weiterhin konnte eine spezifische Bindung des 83kd Glykoproteins an die Lektine Concanavalin A und Weizenkeimagglutinin feststellt werden (Wieland et al., 1986). Die relativ breite 83kd Proteinbande in der SDS-Gelelektrophorese reflektiert wahrscheinlich eine unterschiedliche Glykosylierung des Proteins, die zur Auftrennung im Gel beiträgt. Die möglichen Unterschiede in den Kohlenhydratresten konnten durch isoelektrische Fokussierung im zweidimensionalen Gelsystem deutlich gemacht werden. Dabei ist auffallend, daß das NORM-2 Antigen in einem relativ sauren pH-Bereich (4,3 - 5,1) fokussiert. Nach der Abspaltung der N-glykosidisch gebundenen Zuckerreste mit Endoglycosidase F wurde das Molekulargewicht des NORM-2 Antigens auf 72kd reduziert. Das 72kd Proteingerüst wurde auch nach der Behandlung der Bl6 Melanomazellen mit Tunicamycin immunpräzipitiert. Dies bedeutet, daß die antigene Determinante des Norm-2 Antigens auf dem Proteinteil lokalisiert ist. Für diese Schlußfolgerung gab es weitere Hinweise, zum Beispiel erkennt der Antikörper das DTT-reduzierte NORM-2 Antigen nicht mehr. Alle bisher durchgeführten Versuche, das NORM-2 Antigen unter

verschiedenen Bedingungen (z.B. niedere SDS-Konzentration und Abwesenheit reduzierender Agenzien) im Western Blot nachzuweisen, blieben erfolglos. Insgesamt kann aus diesen Beobachtungen geschlossen werden, daß die antigene Determinante durch die Konformation des NORM-2 Antigens, zum Beispiel durch die korrekte Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken, gebildet wird. Aufgrund der guten Markierbarkeit mit ^{35}S-Cystein scheint das 105/83kd Antigen ein cysteinreiches Protein zu sein. Für verschiedene Wachstumsfaktor-Rezeptoren sind cysteinreiche "cluster" charakteristisch, und wahrscheinlich sind sie am Aufbau der Bindungsstelle für den Liganden beteiligt (Downward et al., 1984; Ullrich et al., 1985). Im Gegensatz dazu weist der schwache Einbau von ^{35}S- Methionin und die Resistenz des 83kd Proteins gegenüber der Fragmentierung durch Bromcyan daraufhin, daß das NORM-2 Antigen nur wenige Methionine enthält (die Versuche zur Spaltung mit Bromcyan wurden von Dr. W. Birchmeier durchgeführt).

Unter nichtreduzierenden Gelbedingungen besitzt das NORM-2 Antigen ein Molekulargewicht von 105kd, demnach ist es kein über Disulfidbrücken kovalent verknüpftes Homo-Oligomer. Gewöhnlich wandern disulfidhaltige monomere Proteine im SDS-Polyacrylamid Gel schneller als ihre reduzierten Varianten; sie scheinen unter nicht reduzierenden Bedingungen also kompakter zu sein. Für das NORM-2 Antigen trifft jedoch gerade das Umgekehrte zu. Die Tatsache, daß das Antigen in Abwesenheit reduzierender Agenzien ein Molekulargewicht von 105kd

aufweist, kann auf zwei verschiedenen Ursachen beruhen. Die intramolekularen Disulfidbrücken könnten dem NORM-2 Antigen eine ungewöhnliche, vielleicht stark polarisierte Tertiärstruktur verleihen, welche die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel beeinträchtigt. Alternativ dazu könnte das 83kd Protein in kovalenter Assoziation mit einer niedermolekularen Komponente vorkommen, die durch reduzierende Agenzien abgespalten wird. Hinweise auf die Präsenz einer leichten Kette ergaben sich aus Immunpräzipitationen oberflächenjodierter und ^{35}S-cystein-markierter Bl6 Melanomazellen; in einigen Fällen zeigte die Analyse unter reduzierenden Gelbedingungen zusätzlich zur 83kd Proteinbande radioaktives Material an der Gelfront.

Die integrale Membranlokalisation des 105/83kd NORM-2 Antigens wurde durch die Notwendigkeit von Detergenzien für dessen Extraktion demonstriert. Die Papainbehandlung der Bl6 Melanomazellen setzt ein extrazelluläres 60kd Fragment des 83kd Glykoproteins frei, das vom NORM-2 Antikörper immer noch erkannt wird. Daraus kann geschlossen werden, daß das NORM-2 Antigen sehr wahrscheinlich ein transmembranes Oberflächenprotein ist, dessen zytoplasmatische Domäne vermutlich relativ klein ausfällt. Für verschiedene Membranproteine wurde gezeigt, daß sie mit dem Zytoskelett der Zelle assoziiert sein können und deshalb nur schwer aus dem tritonunlöslichen Zellmaterial zu lösen sind. Das NORM-2 Antigen konnte größtenteils mit Detergenzien extrahiert werden, was darauf hinweist, daß es entweder keine starken Wechselwirkungen mit Komponenten des Zytoskeletts ein-

geht oder nur eine begrenzte Anzahl der 83kd Proteinmoleküle mit dem zytoskelettalen Netzwerk verbunden sind.

Ein möglicher Kandidat für eine derartige Assoziation des NORM-2 Antigens mit dem Zytoskellet wäre das kopräzipitierte 59kd Protein, das aufgrund der Peptidkartierung und der Auftrennung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese als eine vimentinähnliche Komponente identifiziert wurde. Das Vimentin ist am Aufbau des intermediären Filamentnetzwerks beteiligt. Das kopräzipitierte 59kd Protein scheint jedoch eine gelöste Variante des Vimentins zu sein (Soellner et al., 1986), denn die Immunpräzipitationen aus den verschiedenen subzellulären Fraktionen zeigten, daß die 59kd Komponente nur mit dem 83kd Protein aus dem 100'000g Überstand assoziiert ist. Der Hauptanteil des 83kd Glykoproteins, der im 100'000g Membranpellet konzentriert ist, wird dagegen ohne das 59kd Protein immunpräzipitiert. Durch die vorliegenden Untersuchungen läßt sich nicht völlig ausschließen, daß die Assoziation der 59kd Komponente mit dem 83kd Protein artifiziellen Ursprungs ist. Die Extraktion in Anwesenheit von Detergenzien zerstört die Kompartimentalisierung der Zelle. Damit besteht die Möglichkeit, daß natürlicherweise nie in Kontakt tretende Proteine oder Proteindomänen plötzlich nichtphysiologische Assoziationen eingehen können.

Bedeutung des 105/83kd Glykoproteins in der Wachtums-regulation

Das 105/83kd Glykoprotein ist mit mehreren Eigenschaften ausgestattet, die daraufhinweisen, daß es sich um einen Rezeptor für einen Wachstumsregulator handelt. Die NORM-2 Antikörper üben ihre wachtumshemmende Funktion über dieses integrale Membranprotein auf der Zelloberfläche aus, und die Expression dieses Proteins ist abhängig vom Wachstumszustand der Zellen. Bei der Überlegung, ob es sich bei dem 83kd Glykoprotein um einen der bekannten Rezeptoren handelt, kommen im Prinzip die folgenden Kandidaten in Frage: Der Insulinrezeptor, der Transferrinrezeptor, sowie das melanoma-assoziierte Protein p97 (alle sind proliferationsassozierte Rezeptorproteine für Wachstumsstimulatoren) und die Rezeptoren für die wachstumsinhibitorischen Faktoren Interferon-beta, Interferon-gamma und Lymphotoxin (oder Tumor Nekrosis Faktor). Diese bekannten Rezeptoren unterscheiden sich jedoch im Molekulargewicht und in verschiedenen anderen biochemischen Eigenschaften vom NORM-2 Antigen (Brown et al., 1982; Trowbridge et al., 1982; Thompson et al., 1985; Ullrich et al., 1985; Aggarwal et al., 1985; Rashidbaigi et al., 1986). Zum Beispiel bindet das NORM-2 Antigen kein Eisen-59 im Gegensatz zum melanoma-assoziierten Protein p97 (dieses Experiment wurde in Analogie zu Brown et al., 1982 durchgeführt).

Dagegen ist das 83kd Glykoprotein in vielen biochemischen Eigenschaften ähnlich mit dem Rezeptor des

Nerven Wachtumsfaktors (NGF), der in der humanen Melanomazellinie A875 charakterisiert wurde (Puma et al., 1983; Ross et al., 1984; Grob et al., 1985; Chao et al., 1986). Der NGF-Rezeptor und das 83kd Glykoprotein sind sich ähnlich im Molekulargewicht und im isoelektrischen Punkt. Beide besitzen einen Kohlenhydratanteil von 10 - 15kd, beide binden spezifisch an die Lektine Concanavalin A und Weizenkeimagglutinin, und beide besitzen einen niederen Methioningehalt. Weiterhin wurde gezeigt, daß Melanomazellen, wie zum Beispiel die A875 Zellen, NGF-Rezeptoren überexprimieren, während normale Melanozyten keine oder nur sehr wenige exprimieren (Fabricant et al., 1977; Ross et al., 1984). Diese Befunde sind insofern interessant, weil die ontogentischen Vorläufer der Melanozyten von der Neuralleiste abstammen (Le Douarin, 1982). Viele Abkömmlinge der Neuralleiste benötigen NGF zum Überleben oder für ihre Differzierung (Thoenen and Barde, 1980; Levi-Montalcini, 1982). Aufgrund der "NGF-crosslinking" Experimente mit Zellen der Neuralleiste scheint die frühe embryonale Form des NGF-Rezeptors dem Rezeptor der A875 Melanomazellen ähnlich zu sein (Bernd, 1986). In differenzierten Abkömmlingen der Neuralleiste wurden NGF-Rezeptoren mit anderen Molekulargewichten beschrieben, zum Bespiel wurden in PC12 Phaeochromozytoma Tumorzellen, die von chromaffinen Zellen der Nebenniere abstammen, zwei NGF-Rezeptortypen identifiziert, die sich nicht nur im Molekulargewicht sondern auch in funktioneller Hinsicht unterscheiden (Schechter und Bothwell, 1981; Hosang and Shooter, 1985). Die

Expression des NGF-Rezeptors in Melanomazellen könnte einer teilweisen Dedifferenzierung entsprechen, die den Tumorzellen Eigenschaften der proliferierenden Vorläuferzellen verleiht, oder das Resultat einer transformations-korrelierten Aktivierung des NGF-Rezeptorgens sein. In diesem Zusammenhang spielt der NGF-Rezeptor möglicherweise eine Rolle in der Wachstumsregulation der Melanomazellen.

Um nun festzustellen, ob das NORM-2 Antigen identisch mit dem NGF-Rezeptor ist, wurden Bl6 Melanomazellen durch den NGF-Bindungstest und im indirekten Radioimmunassay mit anderen Zellinien verglichen. Aufgrund der unterschiedlichen quantitativen Verteilung auf verschiedenen Zellen scheint es, daß das NORM-2 Antigen und der NGF-Rezeptor nicht identisch sind. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß das 83kd NORM-2 Antigen der Bl6 Melanomazellen eine mutierte Rezeptorform repräsentiert, welche eine reduzierte Affinität für den Liganden besitzt oder sogar die Bindungsfähigkeit für NGF verloren hat. Die schwache Bindung des NORM-2 Antikörpers an humane Melanomazellen könnte auf der Spezies-Spezifität beruhen, die für andere monoklonale Antikörper gegen den NGF-Rezeptor gezeigt wurde (Ross et al., 1985). Den eindeutigen Beweis für eine mögliche Verwandtschaft dieser beiden Rezeptoren wird der Vergleich der Aminosäuresequenzen erbringen.

Interessanterweise korreliert die Expression des 83kd Proteins mit dem Wachstumszustand der Bl6 Melanoma-

zellen. Im Vergleich zu proliferierenden Bl6 Zellen ist die NORM-2 Antigenmenge in wachtumsgehemmten Zellen, die bei niederen Serumkonzentrationen oder bei hoher Zelldichte kultiviert wurden, auf ein Zehntel reduziert. Werden gehemmte Bl6 Zellen im Wachstum restimuliert, steigt die 105/83kd Proteinmenge während der DNS-Synthesephase (S-Phase) drastisch an. Verschiedene Rezeptoren für Hormone oder Wachstumsfaktoren zeigen ein ähnliches Verhalten. Zum Beispiel wird die Expression der Rezeptoren für Insulin, Transferrin, NGF und Interleukin-2 ebenfalls in der S-Phase proliferierender Zellen quantitativ erhöht (Revoltella et al., 1974; Shimizu et al., 1981; Cantrell and Smith, 1983). Die NORM-2 Antikörper blockieren die Wachstumsstimulierung inhibierter Bl6 Melanomazellen in der G0/G1 Phase noch bevor die 83kd Rezeptormenge exponentiell ansteigt. Anscheinend vermitteln die wenigen während der G0/G1 Phase exprimierten 83kd Rezeptormoleküle das hemmende Signal des NORM-2 Antikörpers, welches die Effekte der Serumstimulierung unterdrückt. Eine ähnliche Wirkung haben Antikörper gegen das nukleäre p53 Protein. Die Wachtumsstimulierung ruhender Fibroblasten wird in der G0/G1 Phase blockiert, wenn gleichzeitig mit der Serumzugabe anti-p53 Antikörper in die Kerne der Zellen mikroinjiziert werden (Mercer et al., 1982). Die Konzentration des nukleäre Protein p53 erhöht sich jedoch erst in der späten G1-Phase serumstimulierter Fibroblasten (Reich and Levine, 1984).

Die Hemmung des Zellwachstums durch Antikörper, die an Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden, kann auf verschiedene Weise ausgelöst werden (siehe dazu auch in der Einleitung). Repräsentativ für die Hemmung durch Antigenmodulation sind die Antikörper gegen das neu-Onkogenprodukt p185, welche die Rezeptoren von der Oberfläche neu-transformierter Zellen herunterregulieren. Konsequenterweise sind die neu-transformierten Zellen im Wachstum gehemmt (Drebin et al., 1985). Die NORM-2 Antikörper vermitteln ihren wachstumsinhibierenden Effekt dagegen direkt über die Bindung an das 105/93kd Oberflächenprotein und bewirken keine Veränderung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche. Auf ähnliche Weise funktionieren die monoklonalen Antikörper von Yagita et al. (1986), welche die Proliferation verschiedener Tumorzellen reversibel hemmen. Diese Antikörper erkennen ein heterodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 125-130kd, das aus einer 90-95kd und einer disulfidgebundenen 30-35kd Untereinheit besteht. Dieses 125-130kd Protein wird auf der Oberfläche verschiedener transformierter aber auch auf normalen, proliferierenden Zellen exprimiert (Azzarone et al., 1984; Yagita et al., 1986).

"Transforming growth factor-ß" kann sowohl stimulierend als auch inhibierend auf verschiedene Zellen wirken (siehe Einleitung). Die Behandlung der Bl6 Melanomazellen mit TGF-ß führt zur spezifischen Herunterregulierung der NORM-1 Antigenexpression und zur Wachstumshemmung der Zellen (Wieland et al., 1986). Durch Immunpräzipitationen aus radioaktiv markierten Bl6

Zellen konnte gezeigt werden, daß die TGF-ß Behandlung die Neusynthese des 83kd Proteins beeinträchtigt und infolgedessen seine Expression auf der Zelloberfläche verringert wird. In anderen experimentellen Systemen konnte gezeigt werden, daß TGF-ß auf indirekte Weise die Expression verschiedener Rezeptoren modulieren kann. Zum Beispiel wirkt TGF-ß regulierend auf die Anzahl der EGF-Rezeptoren in NRK-Fibroblasten (Assoian et al., 1985; Massague, 1985). In aktivierten T-Lymphozyten inhibiert TGF-ß die proliferationsassoziierte Expression der Rezeptoren für die Wachstumsfaktoren Interleukin-2 und Transferrin. Einhergehend damit sind T-Zellen in ihrer weiteren Wachtumsfähigkeit gehemmt. Ein wichtiger Befund ist, daß die Rezeptoren für TGF-ß selbst in aktivierten aber nicht in ruhenden T-Lymphozyten exprimiert werden (Kehrl et al., 1986). Die Rezeptoren für TGF-ß werden nicht über den liganden-induzierten Mechanismus herunterreguliert (Massague and Like, 1985; Fanger et al., 1986). Anscheinend wird die Anzahl der TGF-ß Rezeptoren also ebenfalls auf indirekte Weise, vielleicht sogar in Antwort auf die Effekte des eigenen Liganden auf die Zelle, geregelt.

Aufgrund von "crosslinking" Experimenten mit jodiertem TGF-ß wurden zwei Rezeptortypen identifiziert: Ein homodimerer, hochmolekularer Komplex mit einem Molekulargewicht von 560kd und ein monomerer Typ mit einem Molekulargewicht von 80-85kd (Massague and Like, 1985). Natürlich stellte sich die Frage, ob das 83kd NORM-2 Antigen etwa identisch ist mit dem 80-85kd TGF-ß-

Rezeptor, zumal für beide eine proliferationsassoziierte Expression gegeben ist, und die physiologischen Effekte der NORM-2 Antikörper und von TGF-ß auf B16 Melanomazellen ähnlicher Natur sind. Auch in diesem Fall konnte jedoch keine Korrelation hinsichtlich der NORM-2 Antikörper- und der TGF-ß-Bindung auf verschiedenen Zellinien festgestellt werden, und demzufolge die Identität der beiden Rezeptoren nicht bewiesen werden.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, daß das 105/83kd NORM-2 Antigen in das Netzwerk der Wachtumsregulation integriert ist. Proliferierende B16 Melanomazellen exprimieren das 105/83kd Protein, während B16 Zellen, die bei hoher Zelldichte, durch die Behandlung mit TGF-ß oder durch Serumentzug im Wachstum gehemmt sind, eine reduzierte Biosynthese des NORM-2 Antigens zeigen. Die Bindung des NORM-2 Antikörpers an das Antigen auf der Oberfläche proliferierender B16 Zellen erzeugt also hinsichtlich der Anzahl freier 105/83kd Rezeptoren einen mit wachtsumsgehemmten Zellen vergleichbaren Zustand (siehe Schema in Abb. 20). Es lassen sich nun folgende Hypothesen aufstellen.

1.) Das 105/83kd NORM-2 Antigen repräsentiert einen Rezeptor für einen nicht identifizierten Wachstumsfaktor, und der NORM-2 Antikörper verhindert dessen Bindung und somit das stimulierende Signal.

2.) Das 105/83kd NORM-2 Antigen stellt eine mutierte, daueraktivierte Rezeptorform dar, analog zu den Produkten des erbB- und neu-Onkogens, und die Bindung des NORM-2 Antikörpers führt über sterische

Mechanismen zu dessen Inaktivierung.

3.) Das 105/83kd NORM-2 Antigen ist ein möglicherweise mutierter Rezeptor für einen Wachtumsinhibitor. In diesem Fall simuliert der NORM-2 Antikörper die Effekte des natürlichen Liganden.

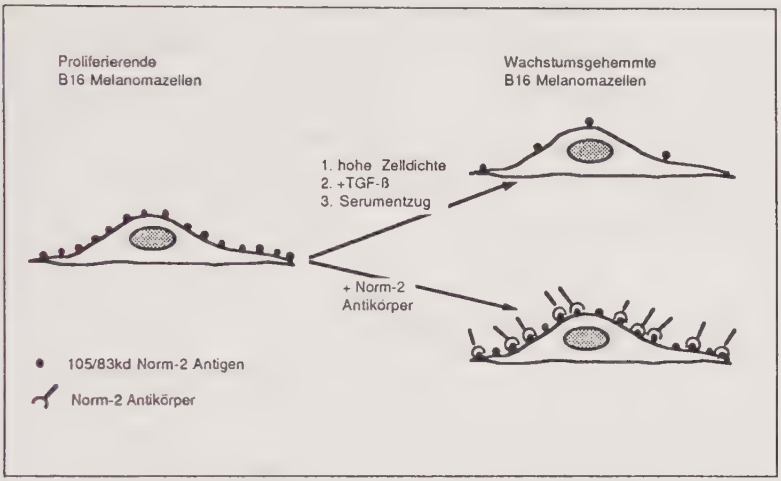


Abb. 20: Schema zur Regulation des NORM2 Antigens in Abhängigkeit vom Wachstumszustand der B16 Melanoma zellen

Es scheint zunächst paradox anzunehmen, daß das proliferationsassoziierte NORM-2 Antigen einen Rezeptor für einen Wachtumsinhibitor repräsentiert. Wenn man jedoch davon ausgeht, daß Zellen zur kontrollierten Proliferation nicht nur stimulatorische sondern auch inhibitorische Signale empfangen können müssen, ist die proliferationsassoziierte Expression eines Rezeptors für einen Wachtumsinhibitor zellphysiologisch sinnvoll. Vielleicht sind diese sogar spezifisch für die

Transition vom proliferierenden zum wachstumsgehemmten Zustand verantwortlich und nicht notwendig für die Aufrechterhaltung des Wachstumsstillstands. Entsprechend dieser Hypothese werden zum Beispiel die TGF-ß Rezeptoren in T-Lymphozyten (Kehrl et al., 1986) und das membranständige Genprodukt des rezessiven oder anti-Onkogens "lethal(2) giant larvae" in Drosophila melanogaster" reguliert (Mechler et al., 1985). Friend et al. (1986) klonierten kürzlich das "Rb anti-Onkogen" von Retinoblastoma- und Osteosarkomazellen und es wäre sicherlich interessant zu erfahren, ob das Genprodukt in ähnlicher Weise reguliert wird.

Weitere experimentelle Vorhaben

Die weitere funktionelle und molekularbiologische Charakterisierung des NORM-2 Antigens wird zeigen, ob es sich um einen Rezeptor für einen Wachtumsstimulator oder Inhibitor handelt. Aufgrund der Aminosäuresequenzdaten sollen mögliche Verwandtschaften zu anderen Rezeptoren aufgeklärt werden. Zu diesem Zweck wurden bereits etwa 100ug des 83kd Proteins aus Bl6 Melanomazellen isoliert. Mit Hilfe polyklonaler Antiseren gegen das NORM-2 Antigen und synthetisch hergestellter Oligonukleotid-Proben, deren Sequenz aus den Aminosäuresequenzdaten abgeleitet werden können, soll die komplementäre DNS (cDNS) des 83kd Proteins aus Expressionsbibliotheken von Bl6 Melanomazellen kloniert werden. Die cDNS des 83kd Proteins aus den Tumorzellen kann zur Identifizierung des homologen Transkripts normaler Zellen und zur Identifizierung des Gens eingesetzt werden. Der

Vergleich der cDNS aus Bl6 Melanomazellen und aus normalen Zellen, sowie der Gene, wird Rückschlüsse über turmorspezifische Veränderungen erlauben. Über DNS-Transfektionsexperimente kann die Expression der cDNS-Klone des 83kd Proteins auf wachtumsstimulierende und inhibierende Funktionen untersucht werden. Das Transkriptionsmuster sowie die Expression des NORM-2 Antigens im Verlauf der Zelldifferenzierung und Ontogenese wird mit Hilfe der polyklonalen Antiseren und der cDNS-Klone ausführlich untersucht werden können.

Aggarwal, B.B., Eessalu, T.E., and Hass, P.E. (1985). Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by γ-interferon. Nature 318, 665-667.

Armelin, H.A., Armelin, M.C.S., Kelly, K., Stewart, T., Leder,P., Cochran, B.H., and Stiles, C.D. (1984). Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet derived growth factor. Nature 310, 655-660.

Ash, J.F., Louvard, D., and Singer, S.J. (1977). Antibody-induced linkages of plasma membrane proteins to intracellular actomyosin-containing filaments in cultured fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5584-5588.

Assoian, R.K., Frolik, C.A., Roberts, A.B., Miller, D.M., and Sporn, M.B. (1984). Transforming growth factor-ß controls receptor levels for epidermal growth factor in NRK fibroblasts. Cell 36, 35-41.

Azzarone B., Suarez H., Mingari M.C., Moretta L., and Fauci A.S. (1984). 4F2 Monoclonal antibody recognizes a surface antigen on spread human fibroblasts of embryonic but not of adult origin. J. Cell Biol.98, 1133-1137.

Bargmann, C.I., Hung, M.-C., and Weinberg, R.A. (1986). Multiple indepentent activation of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. Cell 45, 649-657.

Beguinot, L., Lyall, R.M., Willingham, M.C., and Pastan, I. (1984). Down-regulation of the epidermal growth factor receptor in KB cells is due to receptor internalization and subsequent degradation in lysosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2384-2388.

Bernd, P. (1986). Characterization of nerve growth factor binding to cultured neural crest cells: Evidence of an early developmental form of the NGF receptor. Develop. Biol. 115, 415-424.

Betsholtz, C., Heldin, C.-E., Nister, M., Ek, B., Watson, A., and Westermark, B. (1983). Synthesis of a PDGF-like growth factor in human glioma and sarcoma cells suggest the expression of the cellular homolog of the transforming protein of Simian Sarcoma Virus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 117, 176-182.

Bishop, J.M. (1985). Viral oncogenes. Cell 42, 23-38.

Böhmer, F.-D., Lehmann, W., Noll, F., Samtleben, R., Langen, P., and Grosse, R. (1985). Specific neutralizing antiserum against a polypeptide growth inhibitor for mammary cells purified from bovine mammary gland. Biochem. Biophys. Acta 846, 145-154.

Bourguignon, L.Y.W., and Bourguignon, G.J. (1984). Capping and the cytoskeleton. Int. Rev. Cytology 87, 195-224.

Brown, J.P., Hewick, R.M., Hellström, I., Hellström, K.E., Doolittle, R.F., and Dreyer, W.J. (1982). Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and

functionally related to transferrin. Nature 296, 171-173.

Cantrell, D.A. and Smith, K.A. (1983). Transient expression of IL-2 receptors. Consequences for T cell growth. J. Exp. Med. 158, 1895-1911.

Chao, M.V., Bothwell, M.A., Ross, A. H., Koprowski, H., Lanahan, A.A., Buck, C.R., and Sehgal, A. (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. Science 232, 518-521.

Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., and Laemmli, U.K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecylsulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252, 1102-1106.

Curran, T., Miller, D.A., Zokas, L., and Verma, I.M. (1984). Viral and cellular fos proteins: A comparative analysis. Cell 36, 259-268.

Czech, M.P., Oppenheimer, C.L., and Massague, J. (1983). Interrelationships among receptor structures for insulin and peptide growth factors. Fed. Proc. 42, 2598-2601.

Dalinas, T., Ährlund-Richter, L. Merino, F., Klein,E., and Klein, G. (1981). Reduced humoral and cellular cytotoxic sensitivity in major histocompatibility variants of the YAC (Moloney) lymphoma. Immunogenetics 12, 371-380.

DeLarco, J., and Todaro, G. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4001-4005.

Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Waterfield, M.D. (1984). Close similarities of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. Nature 307, 521-527.

Drebin, J.A., Link, V.C., Stern, D.F., Weinberg, R.A., and Greene, M.I. (1985). Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotpye by monoclonal antibodies. Cell 41, 695-706.

Dyson, P.J., Quade, K., and Wyke, J.A. (1982). Expression of the ASV src gene in hybrids between normal and virally transformed cells: Specific suppression occurs in some hybrids but not in others. Cell 30, 491-498

Elder, J.H., and Alexander, S. (1982). Endo-ß-N-acetylglucosaminidase F: Endoglycosidase from Flavobacterium meningosepticum that cleaves both high-mannose and complex glycoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4540-4544.

Fabricant, R.N., DeLarco, J.E., and Todaro, G.J. (1977). Nerve growth factor receptors on human melanoma cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 565-569.

Fanger, B.O., Wakefield, L.M., and Sporn, M.B. (1986). Structure and properties of the cellular receptor for

tranforming growth factor type ß. Biochemistry 25, 3083-3091.

Feramisco, J.R., Gross, M., Kamata, T., Rosenberg, M., and Sweet, R.W. (1984). Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (T-24) protein results in rapid proliferation of quiesent cells. Cell 38, 109-117.

Folkman, J. (1975). Tumor angiogenesis. in: Cancer 3, ed. F.F. Becker, Plenum Press, New York and London.

Franke, W.W., Schmid, E. Osborn, M., and Weber, K. (1979). Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. J. Cell Biol. 81, 570-580.

Friedman, R.M., and Vogel, S.N. (1983). Interferons with special emphasis on the immune system. Advances in Immunology 34, 97-140.

Friend, S.H., Bernards, R., Rogeli, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M., and Dryja, T.P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature 323, 643-646.

Goodman, S.L., Vollmers, H.P., and Birchmeier, W. (1985). Control of cell locomotion: Perturbation with an antibody directed against specific glycoproteins. Cell 41, 1029-1038.

Grob, P.M., Ross, A.H., Koprowski, H., and Bothwell, M. (1985). Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor. J. Biol. Chem. 260, 8044-8049.

Goustin, A.S., Leof, E.B., Shipley, G.D., and Moses, H.L. (1986). Growth factors and cancer. Cancer Research 46, 1015-1029.

Hanna, N. and Burton, R.C. (1981). Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo. J. Immunol. 127, 1754-1758.

Harper, J.R., and Reisfeld, R.A. (1983). Inhibition of anchorage-independent growth of human melanoma cells by a monoclonal antibody to chondroitin sulfate proteoglycan. J. Natl. Cancer 71, 259-263.

Haustein, D. (1975). Effective radioiodination by lactoperoxidase and solubilization of cell-surface proteins of cultured murine T lymphoma cells. J. Immunol. Methods 7, 25-38.

Heldin, C.-E., and Westermark, B. (1984). Growth factors: Mechanism of action and relation to oncogenes. Cell 37, 9-20.

Higgins, R.C. and Dahmus M.E. (1979). Rapid visualization of protein bands in preparative SDS-polyacrylamid gels. Analyt. Biochem. 93, 257-260.

Hosang, M. and Shooter, E.M. (1985). Molecular characteristics of nerve growth factor receptors on PC12 cells. J. Biol. Chem. 260, 655-662.

Houck, J.C. and Attallah, A.M. (1975). Chalones (specific endogenous mitotic inhibitors) and cancer. in: Cancer 3, ed. F.F. Becker, Plenum Press, New York and London.

Howell, N. and Sager, R. (1981). Genetic analysis of tumorigenesis: VIII. Suppression of SV40 transformation in cell hybrids and cytoplasmic transferants. Cytogenet. Cell Genet. 31, 214-227.

Hsu, Y.-M., and Wang, J.L. (1986). Growth control in cultured 3T3 fibroblasts V. Purification of an Mr 13,000 polypeptide responsible for growth inhibitory activity. J. Cell Biol. 102, 362-369.

Imhof, B.A., Vollmer, H.P., Goodman, S.L., and Birchmeier, W. (1983). Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: Specific perturbation using a monoclonal antibody. Cell 35, 667-675.

Kahn, C.R., Baird, K.L., Jarrett, D.B., and Flier, J.S. (1978). Direct demonstration that receptor cross-linking or aggregation is important in insulin action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4209-4213.

Kearny, J.F., and Lawton, A.R. (1975). B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. J. Immunol. 115, 671-676.

Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. (1986). Production of transforimg growth factor ß by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. J. Exp. Med. 163, 1037-1050.

Kessler, S.W. (1975). Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbant: Parameters of the interaction of antibody antigen complexes with protein A. J. Immunol. 115, 1617-1624.

Klein, G. (1983). Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell derived tumors in mice and men. Cell 32, 311-315.

Klein, G. and Klein, E. (1985). Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. Nature 315, 190-195.

Kuli, F.C., Jacobs, S.Jr., and Cuatrecasas, P. (1985). Cellular receptors for ^{125}I-labeled tumor necrosis factor: Specific binding, affinity labeling, and relationship to sensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5756-5760.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Land, H., Parada, L.F., and Weinberg, R.A. (1983). Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. Science 222, 771-778.

Lee, S.H., Aggarwal, B.B., Rinderknecht, E., Assisi, F., and Chiu, H. (1984). The synergistic anti-proliferative effect of -interferon and human lymphotoxin. J. Immunol. 133, 103-1086.

Le Douarin, N. (1982). The neural crest. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Levi-Montalcini, R. (1982). Developmental neurobiology and the natural history of nerve growth factor. Ann. Rev. Neurosci. 5, 341-362.

Marquardt, H., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Twardzik, D.R., DeLarco, J.E., Stephenson, J.R., and Todaro, G.J. (1983). Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: Amino acid sequence homology with epidermal growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4684-4688.

Mason, A.J., Hayflick, J.S., Ling, N., Esch, F., Ueno, N., Ying, S.-Y., Guillemin, R., Niall, H., and Seeburg, P.H. (1985). Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor ß. Nature 318, 659-663.

Massague, J. (1985). Transforming growth factor-ß modulates the high-affinity receptors for epidermal growth factor and transforming growth factor-α. J. Cell Biol. 100, 1508-1514.

Massague, J. and Like, B. (1985). Cellular receptors for type ß transforming growth factor. Ligand binding and affinity labelling in human and rodent cell lines. J. Biol. Chem. 260, 2636-2645.

Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J.D., Wolf, B., Sato, G., and Mendelsohn, J. (1984). Growth inhibition of human tumour cells in athymic mice by anti-epidermal growth

factor receptor monoclonal antibodies. Cancer Research 44, 1002-1007.

Masui, T., Wakefield, L.M., Lechner, J.F., La Veck, M.A., Sporn, M.B., and Harris, C. (1986). Type ß transforming growth factor is the primary differentiation-induced serum factor for normal human bronchial epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2438-2442.

Mechler, B.A., McGinnes, W., and Gehring, W.J. (1985). Molecular cloning of lethal (2) giant larvae, a recessive oncogene of Drosophila melanogaster. EMBO J. 4, 1551-1557.

Mercer,E.W., Nelson, D., DeLarco, A.B., Old, L.J., and Baserga, R. (1982). Microinjection of monoclonal antibody to protein p53 inhibits serum-induced DNA synthesis in 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6309-6312.

Müller, R., Bravo, R., Burckhardt, J., and Curran, T. (1984). Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. Nature 312, 716-720.

Nicolson, G.L. (1982). Cancer metastasis. Organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells. Biochem. Biophys. Acta 695, 113-176.

Nowell, P.C. (1986). Mechanisms of tumor progression. Cancer Research 46, 2203-2207.

O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021.

Old, L.J. (1985). Tumor necrosis factor (TNF). Science 230, 630-632.

Old, L.J., Stockert, E., Boyse, E.A., and Kim, J.H. (1968). Antigenic modulation: Loss of TL antigen from cells exposed to TL antibody. Study of the phenomenon in vitro. J. Exp. Med. 127, 523-539.

Puma, P., Buxser, S.E., Watson, L., Kelleher, D.J., and Johnson, G.L. (1983). Purification of the receptor for nerve growth factor from A875 melanoma cells by affinity chromatography. J. Biol. Chem. 258, 3370-3375.

Rashidbaigi, A., Langer, J.A., Jung, V., Jones, C., Morse, H.G., Tischfield, J.A., Trill, J.J., Kung, H.F., and Pestka, S. (1986). The gene for the human immune .pa interferon receptor is located on chromosome 6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 384-388.

Reich, N.C., and Levine, A.J. (1984). Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in non-transformed cells. Nature 308, 199-201.

Revoltella R., Bertolini L., and Pediconi M. (1974). Unmasking of nerve growth factor membrane-specific binding sites in synchronized murine C1300 neuroblastoma cells. Exp. Cell Res. 85, 89-94.

Risse, G. (1984). Diplomarbeit über die "Biochemische Charakterisierung eines Tumorantigens" an der Erberhard-

Karls-Universität, Tübingen.

Roberts, A.B., Anzano, M.A., Wakefield, L.M., Roche, N.S., Stern, D.F., and Sporn, M.B. (1985). Type ß transforming growth factor: A bifunctional growth regulator of cellular growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 119-123.

Rosenthal, A., Lindquist, P.B., Bringmann, T.S., Goeddel, D.V., and Derynck, R. (1986). Expression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor- cDNA results in transformation. Cell 46, 301-309.

Ross, A.H., Grob, P., Bothwell, M., Elder, D.E., Ernst, C.S., Marano, N., Ghrist, B.F.D., Slemp, C.C., Herlyn, M., Atkinson, B., and Koprowski, H. (1984). Characterization of nerve growth factor receptor in neural crest tumors using monoclonal antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6681-6685.

Saemundsen, A.K., Purtilo, D.T., Sakamoto, K., Sullivan, J.L., Synnerholm, A.-C., Hanto, D., Simmons, R., Anvret, M., Collins, R., and Klein, G. (1981). Documentation of Epstein-Barr Virus infection in immunodeficient patients with life-threatening lymphoproliferative diseases by Epstein-Barr Virus complementary RNA/DNA and viral DNA/DNA hybridization. Cancer Research 41, 4237-4242.

Sager, R. (1985). Genetic suppression of tumor formation. Advances in Cancer Reasearch 44, 43-68.

Schäfer, E.A. (1916). The endocrine organs. Longmans Green, London.

Schechter, A.L., and Bothwell, M.A. (1981). Nerve growth factor receptors on PC 12 cells: Evidence for two receptor classes with differing cytoskeletal association. Cell 24, 867-874.

Schreiber, A.B., Lax, I., Yarden, Y., Eshar, Z., and Schlessinger, J. (1981). Monoclonal antibodies against receptors for epidermal growth factor induce early and delayed effects of epidermal growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7535-7539.

Seiji, M., Nakano, H. Akiba, H., and Kato, T. (1974). Inhibition of DNA and protein synthesis in melanocytes by a melanoma extract. J. Invest. Dermatol. 62, 11

Shimizu N., Shimizu Y., and Fuller B.B. (1981). Cell-cycle analysis of insulin binding and internalization on murine melanoma cells. J. Cell Biol. 88, 241-244.

Shin, S.-I., Freedman, V.H., Risser, R., and Pollack, R. (1975). Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4435-4439.

Singer, J.S. (1972). The molecular organization of membranes. Ann. Rev. Biochem. 43, 805-833.

Soellner, P., Quinlan, R.A., and Franke, W.W. (1985). Identification of a distinct soluble subunit of an

intermediate filament protein: Tetrameric vimentin from living cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7929-7933.

Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1985). Autocrine growth factors and cancer. Nature 313, 745-747.

Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., Assoian, R.K. (1986). Transforming growth factor ß: Biological function and chemical structure. Science 233, 532-534.

Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., and Vogt, P.K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of Avian Sarcoma Virus is present in normal avian DNA. Nature 260, 170-173.

Steinemann, C., Fenner, M., Binz, H., and Parish, R.W. (1984). Invasive behavior of mouse sarcoma cells is inhibited by blocking a 37,000-dalton plasma membrane glycoprotein with Fab fragments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3747-3750.

Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass, P.E., Figari, I.S., Palladino, M.A.jr., and Shepard, H.M. (1985). Recombinant human tumor necrosis factor-α : Effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. Science 230, 943-945.

Sugimoto, Y., Whitman, M., Cantley, L.C., and Erikson, R.L. (1984). Evidence that Rous Sarcoma Virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2117-2121.

Sullivan, L.M. and Quigley,J.P. (1986). An anticatalytic monoclonal antibody to avian plasminogen activator: Its effect on behavior of RSV-transformed chick fibroblasts. Cell 45, 905-915.

Thoenen, H. and Barde, Y.A. (1980). Physiology of nerve growth factor. Physiol. Rev. 60, 1284-1335.

Tooze, J. (1980). Molecular biology of tumor viruses, Part 2: DNA tumor viruses, Cold Spring Habor Laboratory.

Trowbridge, I.S., and Domingo, D.L. (1981). Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumour cells. Nature 294, 171-173.

Trowbridge, I.S., Lesley, J., and Schulte, R. (1982). Murine cell surface transferrin receptor: Studies with an anti-receptor monoclonal antibody. J. Cell Physiol. 112, 403-410.

Thompson, M.R., Zhang, Z., Fournier, A., and Tau, Y.H. (1985). Characterization of human ß-interferon-binding sites on human cells. J. Biol. Chem. 260, 563-567.

Tucker, R.F., Shipley, G.D., Moses, H.L., and Holley, R.W. (1984). Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type ß transforming growth factor. Science 226, 705-707.

Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.-C.,Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P.H., Grunfeld, C., Rosen, O.M., and Ramachandra, J. (1985).

Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. Nature 313, 756-761.

Vollmers, H.P. and Birchmeier, W. (1983). Monoclonal antibodies inhibit the adhesion of mouse B16 melanoma cells in vitro and block lung metastasis in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3729-3733.

Vollmers, H.P., Imhof, B.A., Wieland, I., Hiesel, A., and Birchmeier, W. (1985). Monoclonal antibodies NORM-1 and NORM-2 induce more normal behavior of tumor cells in-vitro and reduce tumor growth in-vivo. Cell 40, 547-557.

Wakelam, M.J.O., Davies, S.A., Houslay, M.D., McKay, I., Marshall, C.J., and Hall, A. (1986). Normal $p21^{N-ras}$ couples bombesin and other growth factor receptors to inositol phosphate production. Nature 323, 173-176.

Westermark, B., Johnsson, A., Paulsson, Y., Betsholtz, C., Heldin, C.-H., Herlyn, M., Rodeck, U., and Koprowski, H. (1986). Human melanoma cell lines of primary and metastatic origin express the genes encoding the chain of platelet-.pa derived growth factor (PDGF) and produce a PDGF-like growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7197-7200.

Wieland, I., Müller, G., Braun, S., and Birchmeier, W. (1986). Reversion of the transformed phenotype of B16 mouse melanoma: Involvement of an 83kd cell surface glycoprotein in specific growth inhibition. Cell in press.

Yagita, H., Masuko, T., and Hashimoto, Y. (1986). Inhibition of tumor cell growth *in vitro* by murine monoclonal antibodies that recognize a proliferation-associated cell surface antigen system in rats and humans. Cancer Research **46**, 1478-1484.

LEBENSLAUF

18.02.1957	geboren in Schwäbisch Hall, Baden Württemberg Vater: Albert Wieland Mutter: Helene Wieland, geb. Kuhn-Hüttenberger.
1964-1977	Schulbesuch in Schwäbisch Hall.
1977	Abitur am Haushalts- und ernährungswissenschaftlichen Gymnasium in Schwäbisch Hall.
1977-1980	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
1979	Vordiplom in Biologie.
1980-1981	Studium an der Duke University, Durham, North Carolina, USA mit einem Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes.
1981-1983	Weiterführung des Studiums der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
1982	mündliche Diplom-Hauptprüfung in Biologie.
1982-1983	Anfertigung der Diplomarbeit am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft unter der Anleitung von Herrn Dr. Matthias Wabl; Titel der Arbeit: Expression von Delta Immunglobulinketten in somatischen Zellhybriden.
1983	Diplom der Biologie der Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
21.8.- 9.9.1983	Teilnahme am EMBO Kurs "DNA cloning", Organisator Dr. David Glover, Dept. of Biochemistry, Imperial College of Science and Technology, London, England.
1983-1986	Anfertigung der Dissertation unter der Anleitung von Herrn Dr. Walter Birchmeier und Herrn Dr. habil. Rolf Kemler am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft, Tübingen; Titel der Arbeit: Die Bedeutung eines 83kd Glykoproteins bei der Wachstumskontrolle von Melanomazellen.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, Tübingen
W. Bessler, Tübingen
W. Birchmeier, Tübingen
V. Braun, Tübingen
R. Corley, Durham
S. Endow, Durham
K. Handtke, Tübingen
R. Kemler, Tübingen
P. Klopfer, Durham
D. Mecke, Tübingen
K. Schmidt-König, Tübingen
W. Seyffert, Tübingen
M. Wabl, Tübingen
P. Wenk, Tübingen